

Aus der Abteilung für Neuropathologie

Direktor: Prof. Dr. A. Pagenstecher

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



**Die membrangebundenen Matrixmetalloproteinasen und ihre  
Bedeutung für die Astrozytenmigration**

**Inaugural-Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin  
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von:

Raphael Merten

aus

Duderstadt

Marburg, 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:

29.09.2014

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Prof. Dr. A. Pagenstecher

1. Korreferent: Prof. Dr. B. Steiniger

Ich widme diese Arbeit meiner Familie

# Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung .....	1
2. Abstract.....	2
3. Einleitung .....	3
3.1 Die Astrozytome .....	3
3.1.1 Klassifikation.....	4
3.1.2 Epidemiologie und Ätiologie .....	5
3.1.3 Therapie .....	5
3.1.4 Prognose .....	6
3.2 Die membrangebundenen Matrixmetalloproteinasen.....	6
3.2.1 Einteilung der Matrixmetalloproteinasen .....	6
3.2.2 Strukturelle Eigenschaften der MT-MMP .....	8
3.2.3 Regulation der MT-MMP .....	10
3.2.4 Funktionen der MT-MMP.....	14
3.2.5 Mögliche Substrate der MT-MMP in der Extrazellulärmatrix des ZNS .....	16
3.2.6 MT-MMPs in physiologischen sowie pathologischen Prozessen.....	17
3.2.7 Expression im normalen Gehirn und Astrozytomen.....	19
3.3 Zielsetzung dieser Arbeit .....	20
4. Material und Methoden .....	21
4.1 DNA-Techniken.....	21
4.1.1 Klonierung des MIGR-II .....	22
4.1.2 Klonierung der <i>mt-mmp</i> cDNAs in den MIGR-I- und MIGR-II-Vektor.....	24
4.1.3 Transformation der ligierten DNA .....	25
4.1.4 Mini-Präparation.....	26

4.1.5 Überprüfung der Proben .....	27
4.1.6 Schnelltransformation.....	27
4.1.7 Maxi-Präparation .....	28
4.1.8 Genotypisierung der Tp53 <sup>-/-</sup> -Mauslinie .....	28
4.2 Zellkultur-Techniken .....	30
4.2.1 Transfektion der Phoenixzellen .....	31
4.2.2 Präparation der Astrozyten .....	32
4.2.3 Transduktion der Tp53 <sup>-/-</sup> -Astrozyten .....	33
4.3 RNA-Nachweis der humanen und murinen MT-MMP .....	33
4.3.1 RNA-Extraktion aus Astrozyten .....	34
4.3.2 RNase-Protection-Assay (RPA).....	34
4.3.2.1 Synthetisieren der Sonde, Szintillationsmessung und Hybridisierung ...	35
4.3.2.2 Präparation der Proben für den Gel-Lauf .....	36
4.3.2.3 Gelvorbereitung und Auftragen auf das Gel.....	37
4.4 Western-Blot für die humanen MT-MMP Proteine .....	38
4.4.1 Probengewinnung aus den transduzierten Astrozyten .....	38
4.4.2 Western-Blot .....	39
4.5 Immunzytochemie für die humanen MT-MMP Proteine .....	43
4.6 Gelatin-Zymographie.....	44
4.6.1 Gewinnung der konditionierten Überstände .....	45
4.6.2 Zymographie.....	46
4.7 Peptid-Substratassay mit fluorogenen Substraten .....	47
4.7.1 Zellpräparation.....	48
4.7.2 Durchführung .....	48
4.8 Migrations- und Invasionsassays.....	50
4.8.1 <i>Scratch</i> -Assay .....	50

4.8.2 Matrigel-Invasions-Assay.....	51
4.8.3 OPoSSM-Assay .....	52
4.8.3.1 OPoSSM-Assay: Aufbau .....	52
4.8.3.2 Auswertung der Astrozytenwanderung in den Rückenmarksschnitten ....	54
4.8.3.3 Immunzytochemie der Astrozyten in den Rückenmarksschnitten .....	55
4.8.3.4 Semidünnschnitte und konfokale Mikroskopie der Rückenmarksschnitte .....	56
5. Ergebnisse.....	58
5.1 Allgemeine DNA-Techniken .....	58
5.1.1 Klonierung .....	58
5.1.2 Genotypisierung der Tp53 <sup>-/-</sup> -Mauslinie .....	59
5.2 Zellkulturnachweise.....	59
5.2.1 Transfektion .....	59
5.2.2 Transduktion der Tp53 <sup>-/-</sup> -Astrozyten .....	60
5.3 RNase-Protection-Assay (RPA).....	61
5.4 Western-Blot für die humanen MT-MMP Proteine .....	65
5.4.1 MT1-MMP .....	66
5.4.2 MT2-MMP .....	67
5.4.3 MT3-MMP .....	68
5.4.4 MT4-MMP .....	68
5.4.5 MT5-MMP .....	70
5.4.6 MT6-MMP .....	70
5.5 Immunzytochemie für die humanen MT-MMPs in den Astrozyten .....	71
5.6 Gelatin-Zymographie.....	72
5.7 Peptid-Substratassay mit fluorogenen Substraten für humanes MT1- und MT4-	

MMP.....	74
5.8 Migrations- und Invasionsassays.....	76
5.8.1 <i>Scratch</i> -Assay.....	76
5.8.2 Matrigel-Invasions-Assay.....	78
5.8.3 Der OPoSSM-Assay.....	80
5.8.3.1 Astrozytenmigration im OPoSSM-Assay.....	80
5.8.3.2 Migrationsauswertung.....	83
6. Diskussion.....	86
6.1 Auswahl muriner Tp53 <sup>-/-</sup> -Astrozyten und Transduktion mit Retroviren.....	86
6.2 Expression und Aktivität der humanen MT-MMP.....	87
6.2.1 RNase Protection Assay.....	87
6.2.2 Western Blot für die humanen MT-MMPs.....	88
6.2.3 Immunzytochemie für die humanen MT-MMPs.....	89
6.2.4 Gelatin-Zymographie.....	90
6.2.5 Peptid-Substratassay mit fluorogenen Substraten.....	91
6.3 Einfluss der humanen MT-MMP auf die Migrationsfähigkeit von murinen Astrozyten.....	92
6.3.1 <i>Scratch</i> -Assay.....	92
6.3.2 Matrigel-Invasionsassay.....	93
6.3.3 Der neue OPoSSM-Assay.....	94
6.3.3.1 Das Modell.....	94
6.3.3.2 Ergebnisse des OPoSSM-Assay.....	96
6.4 Die Organisation von Astrozyten in ZNS-typischem Gewebe.....	97
6.5 Abschließende Bewertung und Ausblick.....	99
7. Anhang.....	101
7.1 Oligonukleotide.....	101

7.1.1 Vektorherstellung:.....	101
7.1.2 Sequenzierung: .....	101
7.2 Verbrauchsmaterialien .....	101
7.3 Geräte.....	103
7.4 PSG-5-Vektor .....	106
7.5 Klonierung .....	106
7.6 Aufführung einer Auszählung der Rückenmarksschnitte der Zellreihe A3 .....	108
8. Literaturverzeichnis .....	110
9. Abkürzungsverzeichnis .....	120
10. Abbildungsverzeichnis .....	125
11. Tabellenverzeichnis .....	127
12. Veröffentlichungsliste .....	129
13. Verzeichnis der akademischen Lehrer .....	130
14. Danksagung .....	131



## 1. Zusammenfassung

Trotz einer Vielzahl von Therapieansätzen ist die Prognose der Astrozytome nach wie vor ungünstig, da durch die diffuse Infiltration der Tumorzellen in das Hirnparenchym eine Resektion unmöglich ist. Auch Chemotherapeutika und Radiotherapie zeigen insbesondere auf das infiltrative Wachstum der Tumore nur wenig Wirkung, sodass neue Therapien entwickelt werden müssen, um das Überleben der Patienten zu verlängern. Membrangebundene Matrixmetalloproteinasen (MT-MMPs) sind Endopeptidasen, die Invasivitäts- und Migrationsfördernde Eigenschaften besitzen und in Astrozytomen verstärkt exprimiert werden. Daher war es das Ziel dieser Arbeit, die Rolle der MT-MMPs in der Pathophysiologie der Astrozytome zu untersuchen.

Für die Untersuchung wurden primäre murine Tp53-defiziente Astrozyten (Tp53<sup>-/-</sup>) retroviral mit einem der sechs humanen MT-MMP transduziert und die Expression der mRNA und der Proteine der MT-MMPs gemessen. Zur Beurteilung der Wirkung der unterschiedlichen MT-MMP wurden ein *Scratch*- sowie Matrigel-Invasions-Assay angewendet. Weiterhin wurde ein neuer organotypischer Migrations- und Invasionsassay auf Grundlage von Rückenmark aus dem Schwein etabliert (OPoSSM (*organotypic porcine spinal slice migration*)-Assay).

Die Astrozyten zeigten in dem *Scratch*-Assay eine stark erhöhte Migration, wogegen der Matrigel-Invasions-Assay ergebnislos blieb. Denn die Astrozyten starben auf der Membran des Assays ab.

Das neu etablierte OPoSSM-Assay stellte sich im Vergleich zu Standardassays (*Scratch*-Assay, Matrigel-Invasions-Assay) als eine besonders kostengünstige, effektive und physiologische Methode heraus. In Semidünnschnitten und der konfokalen Mikroskopie konnte dargestellt werden, dass die Astrozyten in den Rückenmarksschnitten untereinander zu Einzelketten verknüpft an der Basallamina von Gefäßen wandern und dreidimensional in alle Ebenen des Rückenmarkschnittes eindringen. Die Migrationsfähigkeit der Astrozyten wurde in Bezug auf die Infiltrationstiefe und die Gesamtkettenanzahl durch alle MT-MMPs erhöht, wobei MT4- und MT6-MMP die stärksten Pro-Migratoren waren.

## 2. Abstract

Despite all therapeutical progress glial tumors still bear a poor prognosis due to the diffuse infiltration of glioma cells into the surrounding brain – a fact that prevents total resection of the tumor. Furthermore chemotherapy and radiotherapy have only low impact on the growth of the tumour, so new therapy strategies are desperately needed in order to improve the overall survival of patients.

Membrane-bound matrix metalloproteinases (MT-MMPs) are a family of 6 endopeptidases that have the potential to increase the invasion and migration of cells. MT-MMPs are overexpressed in astrocytomas, the effect of these proteins, however, is not fully understood. The aim of this study was to further explore the role of MT-MMPs in the pathophysiology of gliomas.

To evaluate the effect of the different MT-MMPs, primary murine Tp53 deficient astrocytes (Tp53<sup>-/-</sup>) were retrovirally transduced with one of the six human MT-MMP genes and the expression of the respective mRNA and protein was determined. Then, the effect of MT-MMP expression on the migratory potential of the transduced cells was evaluated in Scratch and Matrigel Invasion assays. Furthermore, a novel organotypic migration- and invasion assay (OPoSSM (organotypic porcine spinal slice migration) assay) was developed for measuring the migration ability of the astrocytes in porcine spinal cord.

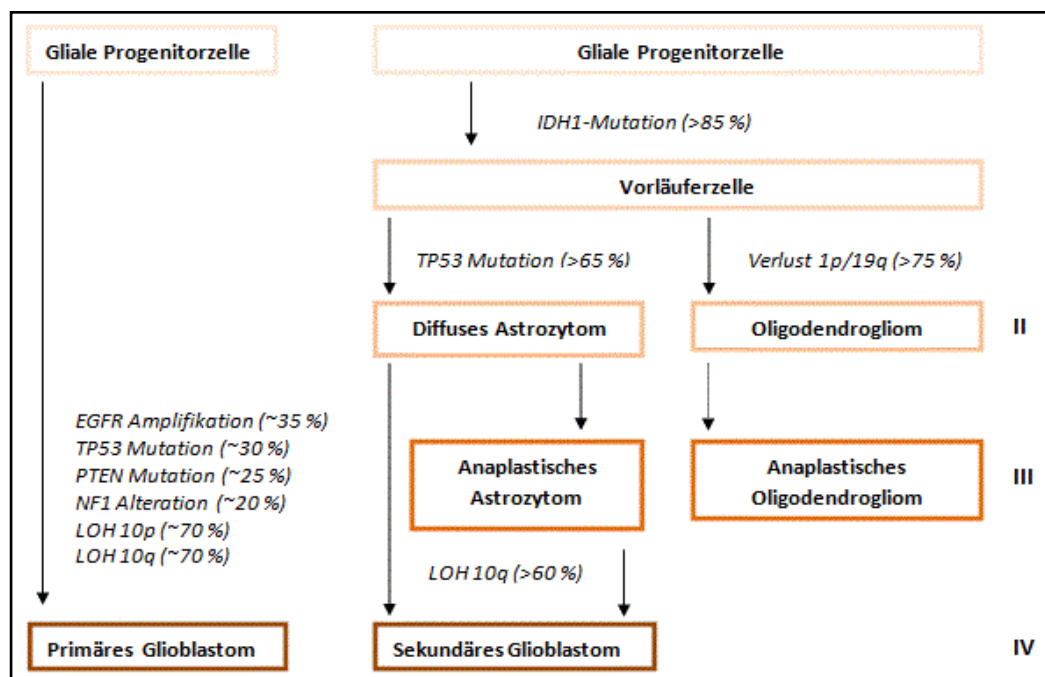
In the Scratch-assay all MT-MMPs strongly enhanced the migration of the astrocytes. In contrast to this, the Matrigel Invasion assay was not capable to measure the migration of the astrocytes, because the astrocytes died above the matrigel membrane. Lastly, the OPoSSM assay was an effective, cheap and physiological assay for the investigation of cell migration in CNS white matter. The OPoSSM assay revealed that all MT-MMPs increase the migration of transduced astrocytes and MT4- and MT6-MMP were the most potent mediators of astrocyte migration in porcine spinal cord.

### 3. Einleitung

Im Folgenden werden die Astrozytome und die membrangebundenen Matrixmetalloproteinasen (MT-MMPs) näher erläutert. Astrozytome sind heutzutage trotz multimodaler Behandlungsansätze durch ihre diffuse Infiltration in das Gehirngewebe noch immer prognostisch ungünstig. Die MT-MMPs werden in den Astrozytomen exprimiert (MT1-, MT2- und MT6-MMP) bzw. im Vergleich zur normalen Expression im Gehirn überexprimiert (MT3-, MT4- und MT5-MMP) und haben auf Astrozytomzellen einen invasions- und migrationsfördernden Einfluss [6, 34, 83, 88, 104, 106, 160]. Hierbei ist der Abbau der Extrazellulärmatrix des zentralen Nervensystems ein entscheidender Faktor.

#### 3.1 Die Astrozytome

Astrozytome sind die häufigsten hirneigenen Tumoren, die aufgrund ihres diffusen, infiltrativen Wachstums selten kurativ behandelbar sind [165].



**Abb. 3.1: Entwicklung der Astrozytome**

Dargestellt ist die Entwicklung der Astrozytomentitäten sowie die verschiedenen Mutationen, die die Transformationen der Progenitorzellen und Vorläuferzellen in die malignen Zellen befördern (modifiziert nach [107]).

Als Ursache für die Entstehung von Astrozytomen werden Mutationen im Tp53-,

EGFR- und Retinoblastom-Signalweg und im IDH1/2-Gen angenommen [19, 107, 119]. Als Ursprungszelle der Astrozytome wird entweder eine maligne Transformation von differenzierten Astrozyten, ein Hervorgehen aus glialen Prekursoren oder neuronalen Stammzellen diskutiert [107].

### 3.1.1 Klassifikation

Zur Beurteilung des Schweregrades eines Astrozytoms dient das WHO-Grading, das die Astrozytome in vier Grade einteilt:

WHO-Grad	Entität	Eigenschaften des Astrozytoms
I	Pilozytische Astrozytom Subependymales Riesenzellastrozytom	Benigne, geringe Proliferation, gut abgegrenzt
II	Diffuses Astrozytom	Niedrig maligne, infiltrativ, progressiv
III	Anaplastisches Astrozytom	Proliferativeres Wachstum, deutliche Malignität, Anaplasie
IV	Glioblastoma multiforme	Rasch infiltrativ, hohe Zelldichte, Nekrose, Angiogenese

**Tab. 3.1: WHO-Grade**

Gemäß der WHO-Klassifikation wird jeder Astrozytomentität ein Grad zugeordnet (nach [70, 85]).

Das pilozytische Astrozytom ist eine benigne Form der Astrozytome, die vor allem bei Kindern in Erscheinung tritt.

Die diffusen (low-grade) Astrozytome des Grades II wachsen dagegen diffus und infiltrativ in den Frontallappen und Temporallappen des Gehirns ein, sind aber erst nach Jahren durch eine Malignisierung zum anaplastischen Astrozytom (Grad III) progredient, welches ein wesentlich aggressiveres Wachstum zeigt. Nach 1-2 Jahren kann sich das anaplastische Astrozytom zum sekundären Glioblastom (Grad IV) entwickeln [62, 70].

Unabhängig von den Astrozytomen entsteht das primäre Glioblastom de novo und ist mit 90 % aller Glioblastome die deutlich häufigere Variante. In den meisten Fällen

entsteht der Tumor im frontotemporalen Cortex und befällt früh die kontralaterale Großhirnhemisphäre [62, 70].

### 3.1.2 Epidemiologie und Ätiologie

Die Astrozytome sind die Neoplasien mit höchster Letalität im zentralen Nervensystem. Die Inzidenz ist mit 0,38-3,05 pro 100000 Einwohnern weltweit aber relativ niedrig [134]. Männer sind mit bis zu 60 % häufiger betroffen als Frauen [119]. Mit 81 % ist der Anteil der Gliome an primären malignen Gehirntumoren besonders groß [112, 134]. Fast die Hälfte der primären malignen Gehirntumore sind Glioblastome [112]. Astrozytome haben eine alterstypische Verteilung der einzelnen Entitäten (s. Tab. 3.2) und werden vor allem zwischen dem 40.-64. Lebensjahr diagnostiziert [134].

Dekade	Alter	Astrozytom-Entität
1. Dekade	0-9 Jahre	Pilozytisches Astrozytom
2. Dekade	10-19 Jahre	Pilozytisches Astrozytom
3. Dekade	20-29 Jahre	Diffuses Astrozytom
4. Dekade	30-39 Jahre	Diffuses Astrozytom
5. Dekade	40-49 Jahre	Anaplastisches Astrozytom
6. Dekade	50-59 Jahre	Glioblastom
7. Dekade	60-69 Jahre	Glioblastom

**Tab. 3.2: Epidemiologie der Astrozytom-Entitäten in Abhängigkeit vom Alter**

(nach [62])

Die Astrozytome sind sowohl hereditären als auch idiopathischen Ursprungs, wobei der ganz überwiegende Großteil idiopathisch entsteht. Hereditäre Ursachen sind z.B. das Li-Fraumeni-Syndrom, die Neurofibromatose I, die tuberöse Sklerose und das Turcot-Syndrom [62].

### 3.1.3 Therapie

Die Therapie richtet sich nach dem Schweregrad der Tumorerkrankung und dem Allgemeinzustand des Patienten. Behandlungserfolge werden durch die chirurgische Resektion mit anschließender Strahlentherapie erzielt. Profitieren können Patienten auch von einer Chemotherapie mit Temozolomid in Abhängigkeit des

Methylierungsstatus des MGMT-Promotors [62, 146].

Das diffuse Wachstum der Astrozytome macht jedoch eine vollständige Resektion unmöglich, oft sind chirurgische Eingriffe wiederholt notwendig. Eingriffe an sensiblen Orten wie der Capsula interna, dem Thalamus, dem Hirnstamm oder dem Rückenmark müssen sehr vorsichtig durchgeführt werden, um eine irreversible Schädigung des Patienten zu verhindern [62].

### **3.1.4 Prognose**

Als Prognosekriterien dienen der histopathologische Befund, die klinische Symptomatik (z.B. Hirndruck, Querschnittssymptomatik) und die biologische Malignität (Proliferationstendenz des Tumors). Allgemein ist die Lebenserwartung nur bei Grad-I-Tumoren gut, da Patienten mit diesem Tumor nach Diagnosestellung noch durchschnittlich 20 Jahre leben. Die Überlebensrate bei diffusen Astrozytomen ist wesentlich geringer, da sich diese zu 70 % nach 5-10 Jahren zum Glioblastoma multiforme entwickeln. Bei der Diagnose eines anaplastischen Astrozytoms beträgt die Lebenserwartung ca. zwei Jahre, beim Glioblastoma multiforme nur knapp ein Jahr [62]

## **3.2 Die membrangebundenen Matrixmetalloproteinasen**

Matrixmetalloproteinasen (MMPs) sind Zink ( $\text{Zn}^{2+}$ )-abhängige Endopeptidasen, die extrazelluläre Matrixproteine und bioaktive Moleküle proteolytisch spalten. Sie modifizieren Rezeptoren an der Zelloberfläche, setzen apoptotische Liganden frei und aktivieren oder inaktivieren Zytokine. Aufgrund ihrer Funktionen spielen sie in der Embryonalentwicklung, der Zellwanderung, der Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Wundheilung und Angiogenese eine entscheidende Rolle [55, 57, 109, 118, 136, 163, 177].

### **3.2.1 Einteilung der Matrixmetalloproteinasen**

MMPs sind die größte Gruppe von Enzymen, die die Extrazellulärmatrix proteolytisch spalten. Bislang wurden 22 humane MMPs identifiziert und in der Reihenfolge ihrer Entdeckung benannt. Daneben gibt es auch eine ältere, eingängigere Bezeichnung, die sich nach der Funktion der jeweiligen MMP richtet. Von den nach Funktionen

eingeteilten acht Gruppen von MMPs werden bei fünf Gruppen die MMPs sezerniert, wohingegen sie bei drei Gruppen membrangebunden sind (s. Tab. 3.3) [81].

Von den membrangebundenen MMPs wurde 1994 als erstes MT1-MMP beschrieben, weshalb es als Zuordnungskriterium für die anderen fünf MT-MMPs diente [132].

Folgende zwei Faktoren wurden zusätzlich für die Einordnung der MT-MMP herangezogen: erstens die Lokalisation der MT-MMP in der Zellmembran und zweitens die spezifische Aktivierung von proMMP-2 *in vitro* mit spezifischer Hemmung durch TIMP-2 (*tissue inhibitor of matrix metalloproteinases*) [34].

Gruppe	S/ M	MMP	Gebräuchlicher Name
Gelatin-bindende MMPs	S	MMP-2	Gelatinase A
	S	MMP-9	Gelatinase B
Minimal-Domänen-MMPs	S	MMP-7	Matrilysin
	S	MMP-26	Endometase, Matrilysin-2
Typische MMPs	S	MMP-1	Collagenase-1
	S	MMP-3	Stromelysin-1
	S	MMP-8	Collagenase-2
	S	MMP-10	Stromelysin-2
	S	MMP-12	<i>Macrophage metalloelastase</i>
	S	MMP-13	Collagenase-3
	S	MMP-19	RASI-1
	S	MMP-20	Enamelysin
	S	MMP-27	-
Furin-aktivierte und sezernierte MMPs	S	MMP-11	Stromelysin-3
	S	MMP-28	Epilysin
Transmembranöse MMPs	M/S	MMP-14	MT1-MMP
	M	MMP-15	MT2-MMP
	M/S	MMP-16	MT3-MMP
	M/S	MMP-24	MT5-MMP
Typ-2 transmembranöse MMPs	M	MMP-23	-
GPI-verankerte MMPs	M/S	MMP-17	MT4-MMP
	M	MMP-25	MT6-MMP

**Tab. 3.3: Einteilung der MMP**

S= Sezerniert, M= Membrangebunden (nach [53, 121, 143])

MT-MMP	Genlocus (Chromosom)	Expression in	cDNA-Länge (in Basenpaaren)	NBCI- Referenz- Sequenz
MT1-MMP	14q11- 12	Lunge, Niere, Gehirn, reaktive Astrozyten, Melanom, Kopf- und Halskarzinome, Lungen- und Magenkarzinome, Gehirntumoren	3400 (1748) bp	NM_00499 5.2
MT2-MMP	16q12.1	Leber, Plazenta, Hoden, Kolon, Dünndarm, Pankreas, Niere, Lunge, Herz, Skelettmuskel, Gehirntumoren	2009 bp	NM_00242 8.2
MT3-MMP	8q21	Plazenta, Larynx, Herz, Gehirn, Harnblasenkarzinom, Gehirntumoren	1823 bp	NM_00594 1.4
MT4-MMP	12q24	Gehirn, Leukozyten, Kolon, Ovar, Brustkarzinome	1554 (1811) bp	NM_01615 5.4
MT5-MMP	20q11.2	Gehirn, Gehirntumoren, Hoden, Pankreas, Lunge	1935 (1937) bp	NM_00669 0.3
MT6-MMP	16p13.3	Leukozyten, Lunge, Milz, kolorektale Karzinome, Gehirntumoren	1686 (1688) bp	NM_02246 8.4

**Tab. 3.4: Genetische Informationen zu den humanen MT-MMPs**

(nach [34, 69, 72, 83, 90, 120, 131-132, 149, 160, 166])

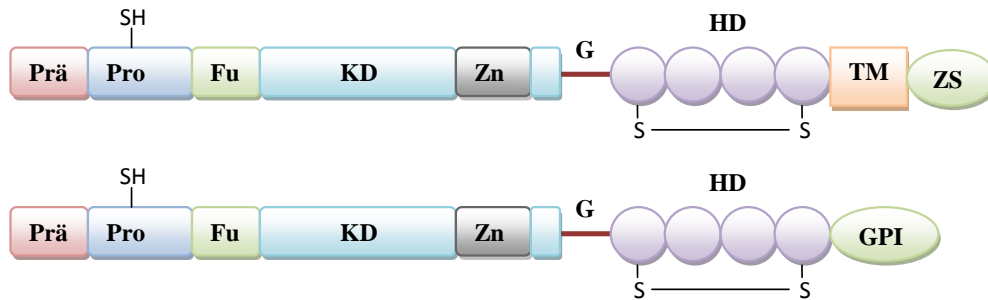
**Spalte 4: Literaturangabe (NBCI-Referenz)**

### 3.2.2 Strukturelle Eigenschaften der MT-MMP

Gemeinsam sind allen MMPs, somit auch MT-MMPs, folgende drei Domänen: eine hydrophobe N-terminale Prädomäne, eine Propeptiddomäne und eine katalytische  $\text{Zn}^{2+}$ -bindende Domäne [81, 103].

Die Prädomäne ist ein Signalpeptid und dient der Adressierung des Propeptids an das endoplasmatische Retikulum sowie der Kennzeichnung des Propeptids als sekretorisches Protein. Darauf folgt die Propeptiddomäne, die durch ihren Cysteinrest an das  $\text{Zn}^{2+}$ -Ion der katalytischen Domäne gebunden ist (s. auch Abb. 3.1) [103]. Durch diese Verbindung wird die inaktive Vorstufe der MMP aufrecht erhalten, sodass es zu einer Inhibition der Aktivierung der MMP kommt [81]. Durch Aufspaltung dieser Verbindung ist eine Aktivierung des Moleküls möglich (s. auch Kapitel 3.2.3) [103]. Das an die katalytische Domäne gebundene  $\text{Zn}^{2+}$ -Ion sorgt für die Stabilität und die Enzymaktivität der MMP [103, 163].





**Abb. 3.2: Proteinstruktur der MT-MMP**

Prä= Prä-Domäne, Pro= Propeptid-Domäne, Fu= Furin-Domäne, KD= Katalytische Domäne, G= Gelenksregion, HD= Hemopexinähnliche Domäne, TM= Transmembrandomäne, ZS= Zytoplasmatische Domäne, GPI= Glykosylphosphatidylinositol-Anker (nach [27]).

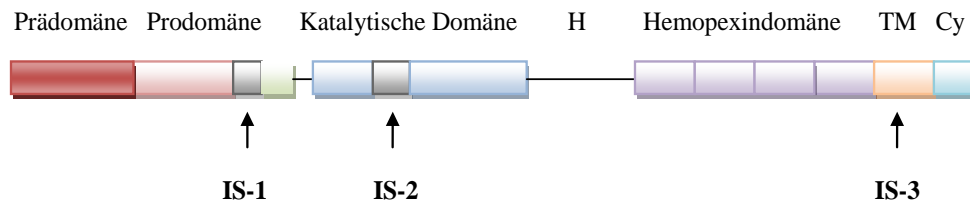
Neben den drei Hauptdomänen gibt es für MT-MMPs spezifische Strukturen: die *hinge*-Domäne (Gelenksregion) als Verbindungsstück zwischen der katalytischen Domäne und der Hämopexindomäne sowie drei Insertionssequenzen (IS-1, IS-2 und IS-3), die zwischen den Hauptdomänen inseriert sind [34].

Die IS-1 ist eine *proprotein convertase cleavage sequence* zwischen der Propeptiddomäne und der katalytischen Domäne. Diese Sequenz spielt möglicherweise eine wichtige Rolle in der Prozessierung der MT-MMP und bei der Aktivierung des proMMP-2 [34, 59, 103].

Die proMMP-2 Aktivierung wird vor allem durch die IS-2 beeinflusst, die sich in der katalytischen Domäne befindet [21, 34].

Die IS-3 befindet sich C-terminal in der transmembranösen Domäne mit dem zytoplasmatischen Schwanz und ist an der Lokalisation der MT-MMP in Invadopodien beteiligt. Für den zytoplasmatischen Schwanz wird ein möglicher Zellsignalweg diskutiert, über den durch Phosphorylierung die Aktivität der MT-MMP intrazellulär kontrolliert werden kann [34, 55, 105, 156]. Statt der transmembranösen Domäne mit zytoplasmatischem Schwanz besitzen MT4- und MT6-MMP einen GPI (Glykosylphosphatidylinositol)-Anker, der diese in der Zellmembran, typischerweise in sogenannten *lipid rafts*, verankert [34-35, 141].

Neben der Lokalisation in der Membran können MT1-, MT3-, MT4- und MT5-MMP auch in löslicher oder abgebauter Form außerhalb der Zelle vorkommen [53].



**Abb. 3.3: IS-Insertionssequenzen**

H= Gelenksregion, TM= Transmembrane Domäne, Cy= Zytoplasmatischer Schwanz (nach [34]).

### 3.2.3 Regulation der MT-MMP

Wie alle Proteasen müssen auch MT-MMPs effektiv reguliert werden, damit sie zum richtigen Zeitpunkt am richtigen Ort und in der nötigen Menge vorhanden sind, um ihre physiologischen Funktionen wahrnehmen zu können [143].

Diese Regulation findet auf vier Ebenen statt: (1) Genexpression, (2) Zymogenaktivierung, (3) Kompartimentierung und (4) die Inhibition des aktiven Moleküls [121].

#### Genexpression:

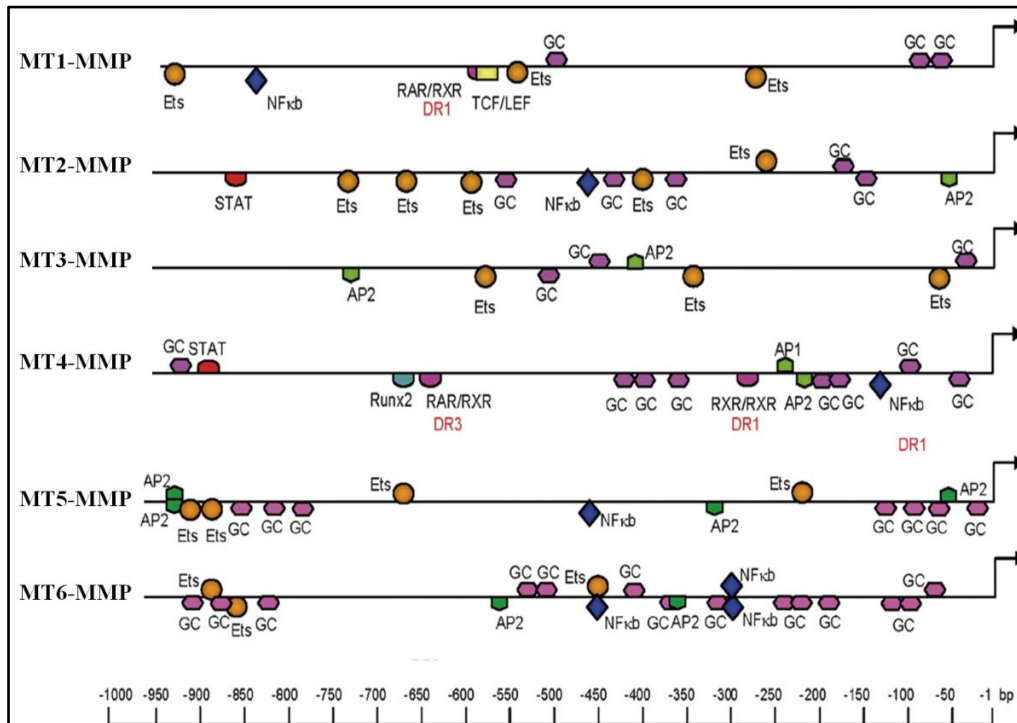
Auf der Ebene der Transkription werden MMPs durch Bindung von trans-Aktivatoren an cis-Elemente der Promotorregion reguliert, die die Transkription supprimieren oder stimulieren. Bei den trans-Aktivatoren handelt es sich unter anderem um AP-2 (Aktivatorprotein 2), Ets (*erythroblastosis twenty six*) oder Sp1 (*specificity protein 1*) [18].

MMPs können nach Promotorregion in drei Gruppen eingeteilt werden: Erstens in Promotoren mit TATA-Box und AP-1-Bindungselement (MMP-1, -3, -7, -9, -10, -12, -13, -19, -26), zweitens in Promotoren mit TATA-Box, aber ohne AP-1-Bindungselement (MMP-8, -11, -15, -21), drittens in Promotoren ohne TATA-Box und AP-1-Bindungselement (MMP-14, -16, -17, -23, -24, -2 ) [18].

Die Expression der MT-MMP ist immer konstitutiv, wird aber von Zytokinen und Wachstumsfaktoren moduliert [17]. Dies sind unter anderem EGF (*epidermal growth factor*), EMMPRIN (*extracellular-matrix-metalloproteinase-inducer*) und TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ) [12, 32-33, 130, 158].

In der folgenden Abbildung soll die Abhängigkeit der Regulation der MT-MMP von

verschiedenen trans-Aktivatoren dargestellt werden. Ob ein MT-MMP durch die Bindung z.B. eines Ets an die Ets-Bindungsstelle induziert oder supprimiert wird, ist abhängig von der Art des Ets und dem MT-MMP [18].



**Abb. 3.4: Promoterbindungsstellen**

Dargestellt ist die Region 1000 Basenpaare vor dem Beginn der Promoterregion und die Bindung durch: AP-1/2= Aktivatorprotein 1/2, Ets= *erythroblastosis twenty-six*, DR1/DR3= *death receptor 1/3*, GC= Guanosin-Cytosin-Box, NFκB= *nuclear factor kappa B*, RAR/RXR= *retinoic acid response element/retinoic x response element*, STAT= *signal transducer and activator of transcription*, Tcf/Lef= *T-cell factor/lymphoid enhancer factor* [18].

Bindungsstelle	Bindungsfaktoren
AP-1	AP-1
AP-2	AP-2
GC-reiche Region	Sp1, Sp3, Egr-1
NFκB	NFκB
RAR/RXR/DR1/DR3	All-trans-Retinoid, 9-cis-Retinsäure
Ets	Ets
Runx2	Runx2
STAT	STAT, src
Tcf/Lef-1	Beta-Catenin/Tcf4

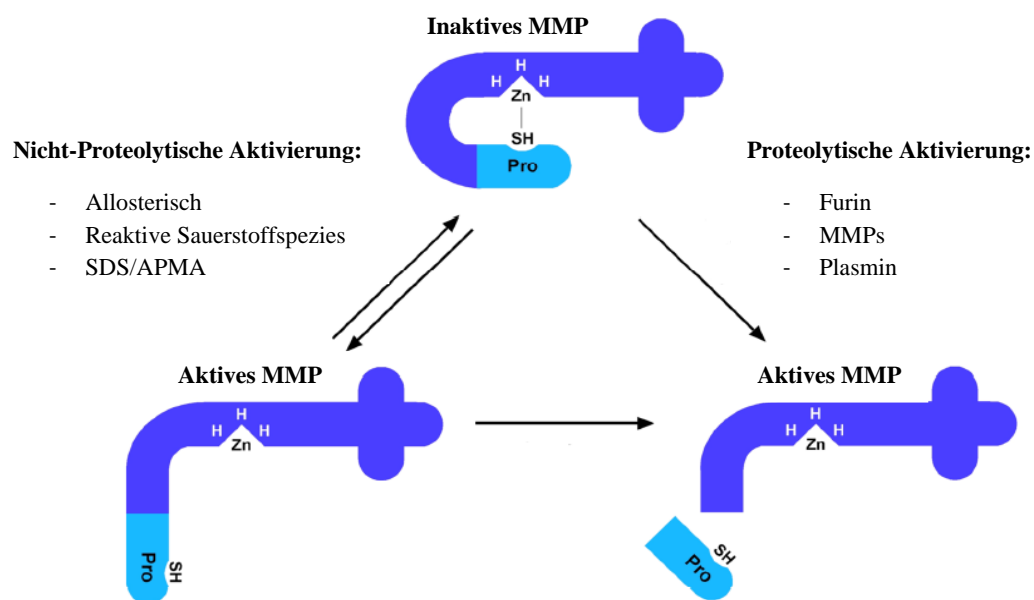
**Tab. 3.5: Bindungsfaktoren zugeordnet zu den Bindungsstellen**

(nach [3, 18, 46, 84, 135, 162])

Darüberhinaus wird die Bildung von MT4-MMP von den HDACi (Histon-Deacetylase-Inhibitoren) induziert [171], die Expression des MT1-MMP durch die Mikro-RNAs MiR-24, -26 und -181 erhöht und des MT3-MMP durch MiR 146a und MiR 328 reprimiert [4, 22, 168].

#### Zymogenaktivierung:

Wie oben dargestellt, werden MT-MMPs als inaktive Vorstufe in die Zellmembran eingebaut und müssen daher noch aktiviert werden. Damit MT-MMPs katalytisch aktiv werden, muss die Cystein-Zn<sup>2+</sup>-Bindung gespalten werden (sogennannter *cystein switch*) [159]. Dies kann proteolytisch sowie nicht-proteolytisch geschehen (s. Abb. 3.4). Serinproteasen wie Furin und Plasmin sowie andere MMPs spalten die Prodomäne mitsamt dem Cysteinrest ab, sodass ein aktives MT-MMP ohne Prodomäne entsteht [111, 121, 152]. Dagegen können allosterische Aktivatoren wie Natriumdodecylsulfat oder reaktive Sauerstoffspezies (ROS) durch die Veränderung des Zn<sup>2+</sup> die Bindung stören, ohne die Prodomäne abzuspalten. Diese wird aber in Folge des Bindungsverlusts autokatalytisch entfernt [121].



**Abb. 3.5: Proteolytische und Non-Proteolytische Aktivierung der MMP**

Aktivierungsmechanismen der MMP durch Faktoren wie SDS oder allosterische Mechanismen (nicht-proteolytisch) sowie durch Proteine (proteolytisch) (modifiziert nach [121]).

Furine sind Typ-1-Membran Subtilisin-ähnliche Serinproteasen und am Golgi-Trans-Netzwerk lokalisiert [34, 152]. Sie binden intrazellulär an die IS-1. Die Furin-gesteuerte Aktivierung wird bei MT1-, MT2-, MT3- und MT5-MMP von Protein 55 verstärkt [127].

Die Prodomäne des MT-MMP kann aber auch nachträglich durch Plasmin an der Zelloberfläche, also extrazellulär abgespalten werden [111].

Nur bei den durch Furinspaltung aktivierten MMPs ist der Aktivierungsmechanismus *in vivo* nachgewiesen, wohingegen bei den restlichen MMPs die Aktivierung bisher nur *in vitro* bekannt ist [121].

### Kompartimentierung:

Die Kompartimentierung als dritte Ebene beschreibt, wo und wie MMPs in die perizelluläre Umgebung abgegeben werden. So werden MT-MMPs nicht ungezielt in die Zellmembran eingebaut, sondern dort, wo Substrat, z.B. Laminin, Kollagen, vorhanden ist [47, 121].

### Inhibition:

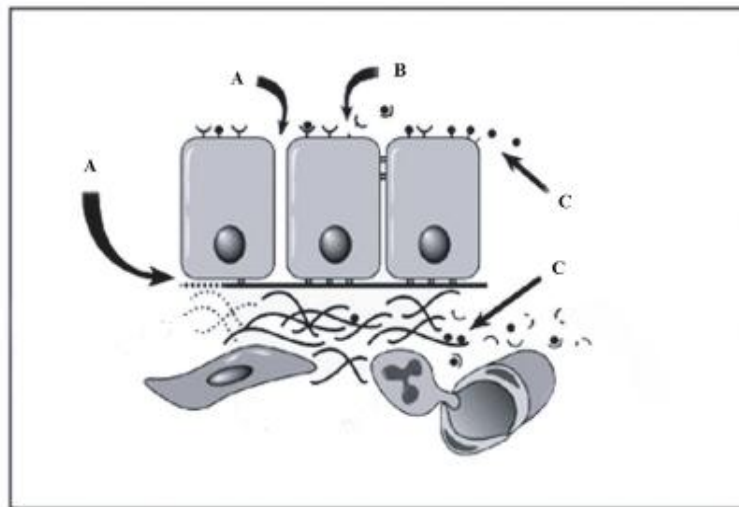
Für die Hemmung eines aktiven MT-MMP stehen endogene Inhibitoren, die *tissue inhibitors of metalloproteinase* (TIMPs), zur Verfügung, die an die katalytische Domäne der MT-MMP binden. Dabei hat jedes MT-MMP sein eigenes TIMP-Inhibitor-Profil. So reagieren die transmembranösen MT-MMPs sehr stark auf die Inhibition durch TIMP-2, TIMP-3 und TIMP-4. TIMP-1 hingegen zeigt nur geringe Hemmwirkung bei transmembranösen MT-MMPs [80, 140].

Im Gegensatz dazu ist TIMP-1 neben TIMP-2 und -3 ein effizienter Inhibitor von MT4- und MT6-MMP [31, 74, 140].

Abgesehen von diesen Inhibitionsmechanismen konnte auch gezeigt werden, dass MT1-MMP mittels Clathrin-abhängiger und -unabhängiger Endozytose und intrazellulärem Recycling inaktiviert werden kann [125].

### 3.2.4 Funktionen der MT-MMP

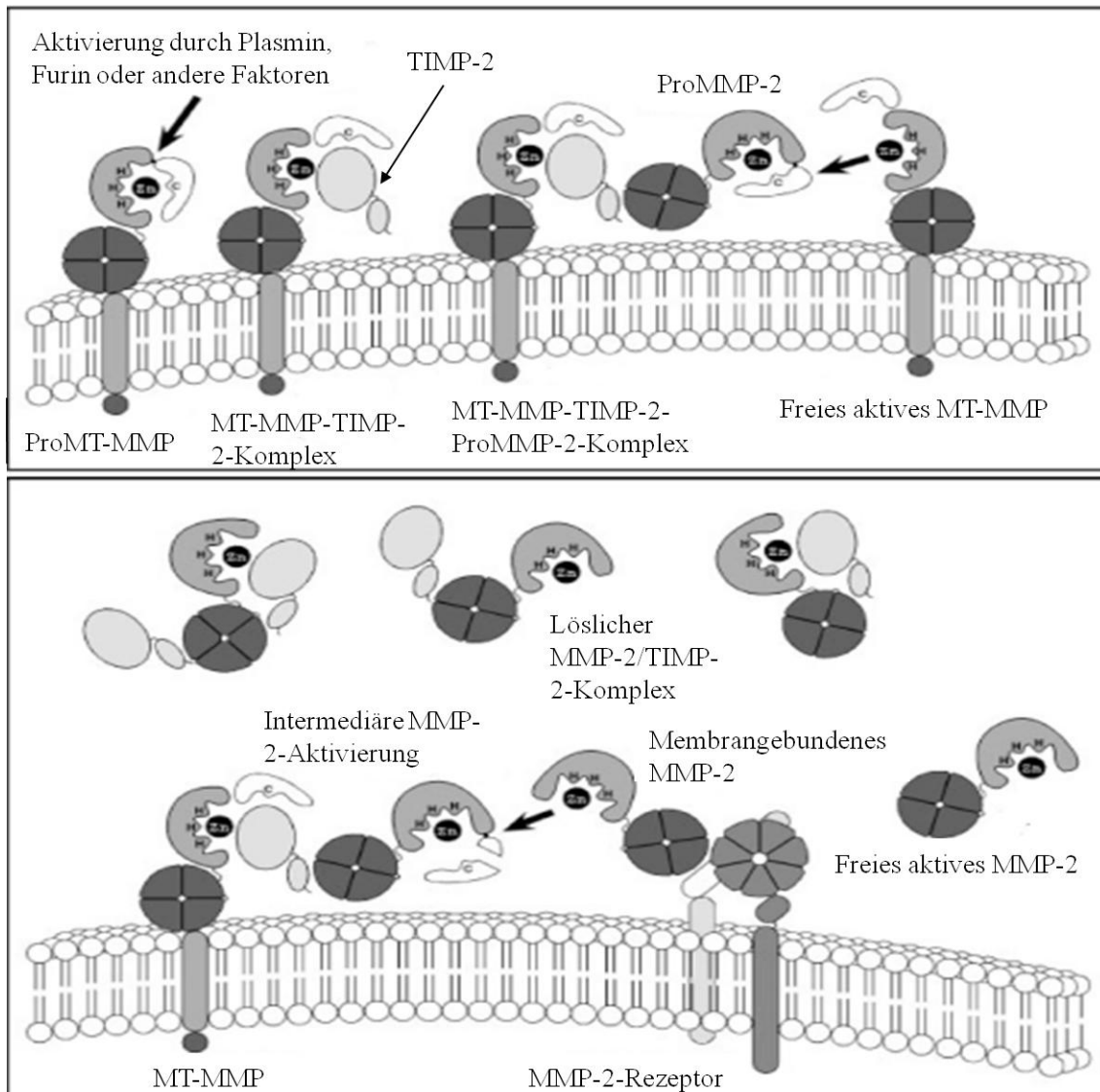
Obwohl den MMPs meist die Funktion zugeordnet wird, extrazelluläre Komponenten zu spalten, haben sie doch ein viel größeres Spektrum an Wirkungen. Sie beeinflussen indirekt und direkt die Interaktion zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix, setzen Wachstumsfaktoren oder andere Signalmoleküle frei oder bauen diese ab. Zudem tragen sie zur Aktivierung und Inaktivierung von Rezeptoren und anderen Molekülen an der Zelloberfläche bei [143].



**Abb. 3.6: Funktionen der MMP**

Die Wirkungsweise der MT-MMP beruht nicht nur auf dem Abbau der extrazellulären Matrix, sondern auch (A) auf der Veränderung der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kommunikation, (B) der Inaktivierung oder Aktivierung von Rezeptoren oder anderen Oberflächenmolekülen der extrazellulären Matrix und (C) dem Abbau oder der Freisetzung von Wachstumsfaktoren oder anderen Signalmolekülen (modifiziert nach [143]).

Gemeinsam ist den transmembranösen MT-MMPs die Aktivierung des proMMP-2, wobei dies bei MT4- und MT6-MMP umstritten ist [32, 140, 160, 164]. Für die Aktivierung müssen ein MT-MMP, TIMP-2 und proMMP-2 in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1:1 vorliegen [143] (s. Abb. 3.6). Dieser Vorgang ist bei MT2-MMP TIMP-2 unabhängig [99].



**Abb. 3.7: MT1-MMP und TIMP-2 abhängige Aktivierung von MMP-2**

Wird ein proMT-MMP durch Plasmin, Furin oder andere Faktoren aktiviert, wird es durch eine Bindung von TIMP-2 gehemmt. Bindet proMMP-2 an das C-terminale Ende des TIMP-2, entsteht ein trimolekularer Komplex. Ein anderes freies, aktives MT-MMP spaltet nun den größten Teil der Propeptidomäne des proMMP-2 ab. Zur endgültigen Aktivierung ist noch ein weiteres MMP-2 nötig, das den Rest der Propeptidomäne abspaltet (modifiziert nach [13, 59, 143]).

Weitere MT-MMP-Substrate sind zur besseren Übersicht tabellarisch aufgeführt.

MT-MMP	Substrate
MT1-MMP	ProMMP-2 <sup>[132, 145]</sup> und -13 <sup>[53, 71]</sup> ; Kollagen 1, 2, 3 <sup>[21, 108]</sup> ; Kollagen 4 <sup>[167]</sup> ; Laminin <sup>[75]</sup> ; Vitronectin, Fibronectin, $\alpha$ 2-Makroglobulin ( $\alpha$ 2-M), $\alpha$ 1-Protease-Inhibitor ( $\alpha$ 1-PI), Fibrinogen, Nidogen, proTNF- $\alpha$ , Gelatine, Perlecan, Fibrillin <sup>[21, 108]</sup> ; Fibrin <sup>[54]</sup> ; EMMPRIN <sup>[26]</sup> ; Surface Tissue Transglutaminase (tTG) <sup>[7]</sup> ; CD44 <sup>[76]</sup> ; Myelin-Inhibitor-Protein (MIP) <sup>[6]</sup> ; Syndecan-1 und -4 <sup>[30, 87]</sup> ; Galectin-3, MCP-3 <sup>[93]</sup> ; Aggrecan <sup>[14, 36]</sup> ; SDF <sup>[94]</sup>
MT2-MMP	ProMMP-2 <sup>[99]</sup> ; proTNF- $\alpha$ , Nidogen, Laminin, Vitronectin, Aggrecan, Fibronectin, Perlecan, Tenascin, Gelatine <sup>[21]</sup> ; tTG <sup>[7]</sup> ; CXCL12 <sup>[174]</sup> ; LPR (CD91) <sup>[129]</sup>
MT3-MMP	ProMMP-2 <sup>[139, 175]</sup> ; Kollagen 3, Fibronectin, Vitronectin, Gelatin, Kasein, $\alpha$ 1-PI, $\alpha$ 2-M <sup>[89, 137]</sup> ; tTG <sup>[7]</sup> ;
MT4-MMP	(ProMMP-2) <sup>[32, 164]</sup> ; proTNF- $\alpha$ , Fibrin, Fibrinogen <sup>[32]</sup> ; Gelatin <sup>[74]</sup> ; ADAMTS4, $\alpha$ 2-Makroglobulin, Low density lipoprotein <sup>[39]</sup>
MT5-MMP	ProMMP-2, proMMP-9 <sup>[83, 116]</sup> ; Dermatansulfat, Chondroitinsulfat, Gelatin, Fibronectin <sup>[164]</sup> ; KISS-1 <sup>[150]</sup> ; Cadherine <sup>[150]</sup>
MT6-MMP	(ProMMP-2) <sup>[73, 122, 160]</sup> ; Gelatin <sup>[122]</sup> ; Kollagen 4, Fibrin, Fibrinogen <sup>[31, 67]</sup> ; Chondroitin, Dermatansulfat, Fibronectin, Urokinase, $\alpha$ 2-M, Laminin, ADAMTS4, $\alpha$ 1-PI, Plasminogen activator receptor, Galectin-3 <sup>[140]</sup> ; <i>Myelin basic protein</i> (MBP) <sup>[138]</sup> ; Vimentin, Sparc, Cystatin C, Galectin-1 und 68 weitere Substrate <sup>[142]</sup>

**Tab. 3.6: Substrate der MT-MMP**

### 3.2.5 Mögliche Substrate der MT-MMP in der Extrazellulärmatrix des ZNS

Um den Einfluss der MT-MMP auf die Migration von Astrozytomzellen zu verstehen, ist es wichtig die Komponenten der Extrazellulärmatrix (EZM) des Gehirns als mögliche Substrate zu beschreiben.

Die EZM setzt sich aus Grundsubstanz und faserigen Anteilen zusammen und verleiht Geweben Form und Festigkeit. Sie besteht aus einer Vielzahl von Makromolekülen, die essentiell für die Verankerung von Zellen sind und die Basis für Zelladhäsion und -migration bilden.

Zu den Bestandteilen der Grundsubstanz gehören die Glykosaminoglykane, die Proteoglykane und die Glykoproteine [5]. Die faserigen Strukturbestandteile sind die Kollagenfasern, sowie retikuläre und elastische Fasern, die von den Fibroblasten gebildet werden.

Die EZM des ZNS besteht vorrangig aus Komponenten wie Hyaluronsäure



(Glykosaminoglykan), Tenascin R (Glykoprotein) und Lecticanen (Proteoglykane) und wird von Astrozyten und Oligodendrozyten gebildet. Sie macht 20 % des menschlichen Gehirns aus [148, 178].

Die Besonderheit der EZM des ZNS besteht darin, dass es keine fibrillären Kollagennetzwerke gibt, sondern nur begrenzt Kollagen 1 und 2, die von leptomeningealen Zellen, Perizyten und glatten Muskelzellen exprimiert und gebildet werden [97, 124, 173]. Bestandteile der EZM wie die Chondroitinsulfat-Proteoglykane (Lecticanen) werden von MT5- und MT6-MMP degradiert, Tenascine von MT2-MMP sowie Kollagen 1 und 2 von MT1-MMP.

Zu den Lecticanen gehört unter anderem Brevican [161], welches von ADAMTS4 degradiert wird. ADAMTS4 wird wiederum von MT4- und MT6-MMP aktiviert [39, 140].

Die Basalmembran (BM) ist ein spezialisierter Teil der EZM, der die epithelialen und endothelialen Zellen von den Zellen des Gewebes abgrenzt [153, 155, 172]. Sie ist das Produkt der Zellen beiderseits der BM. Die BM enthält Komponenten wie Kollagen Typ 4, Laminin, Nidogen und Heparan- und Chondroitinsulfatproteoglykane. Proteoglykane kommen in allen BM-Strukturen vor, in denen sie Wachstumsfaktoren wie FGF-2 (*fibroblast growth factor*) und VEGF (*vascular endothelial growth factor*) immobilisieren. Diese binden Perlecan, welches das vorrangige Heparansulfatproteoglykan in der BM ist [50, 60].

In der BM sind Laminin, Kollagen Typ 4, Nidogen und Perlecan Angriffspunkte für MT1-MMP [21, 48, 75, 108], Laminin, Perlecan und Nidogen auch für MT2-MMP [21] und Kollagen Typ 4 und Laminin für MT6-MMP [31, 67, 140].

### **3.2.6 MT-MMPs in physiologischen sowie pathologischen Prozessen**

So vielfältig wie ihre Funktionen ist auch der Einfluss der MT-MMPs auf physiologische und pathologische Prozesse im Körper des Menschen. Die Beteiligung der MT-MMP an unterschiedlichen physiologischen und pathologischen Prozessen konnte durch das Ausschalten (*knock-down*) beziehungsweise die Überexpression der MT-MMP in spezifischen Geweben analysiert werden [55, 109, 163, 177]. Im Folgenden ist die Bedeutung der MT-MMP an einer Auswahl von Prozessen exemplarisch dargestellt.

### Knochenentwicklung:

Bei der Knochenentwicklung sind Osteoblasten und Osteoklasten für den Auf- und Abbau von Knochenstrukturen essentiell. Bei Mäusen konnte der Zusammenhang zwischen dem Fehlen von MT1-MMP und einem gestörten Knochenstoffwechsel nachgewiesen werden. Der Mangel an MT1-MMP führte zu Minderwuchs, Osteopenie und Arthritis [163].

### Zellproliferation und -apoptose:

Das Zellverhalten wird durch Interaktionen zwischen EZM-Molekülen und Molekülen der Zelloberfläche reguliert, wobei MT-MMPs eine entscheidende Rolle spielen. Sie aktivieren z.B. proTNF- $\alpha$ , welches den programmierten Zelltod von anderen Zellen einleiten kann [32, 163]. Abraham et al. wiesen nach, dass MT2-MMP als anti-apoptotischer Faktor in Tumorzellen wirkt [1].

### Gewebemorphologie:

Die Tatsache, dass MT-MMPs die Fähigkeit besitzen, die Zellorganisation zu bestimmen, macht sie auch in der Gewebemorphogenese zu einem entscheidenden Faktor. Es konnte gezeigt werden, dass MT1-MMP-Antisense-Oligonukleotide in Organkulturen die Entwicklung des Tubulusapparates der Niere hemmen [68].

### Angiogenese:

Als Angiogenese bezeichnet man das Wachstum von neuen Blutgefäßen aus schon vorhandenen Blutgefäßen. Dieser Vorgang ist essentiell für die Tumorprogression, um den wachsenden Tumor mit ausreichend Nährstoffen zu versorgen. Dabei erleichtern die MT-MMPs die Wanderung von Endothelzellen und die Formierung zu neuen Gefäßen durch EZM-Degradation. So ist die Angiogenese in MT1-MMP-defizienten Mäusen und die Bildung kapillärer Gefäße bei Blockierung der MT-MMP gestört [117, 177].

### Tumorprogression:

In vielen malignen Tumoren werden MT-MMPs exprimiert. Sie sind für die

proinvasiven Eigenschaften der Tumoren verantwortlich. Die Stärke ihrer Expression korreliert mit der Progression des Tumors. MT6-MMP wird z.B. in hohem Maße von Dickdarmtumoren produziert und beschleunigt damit das Tumorwachstum [147]. Die gleiche Wirkung hat MT1-MMP in Bezug auf Melanomzellen und Gliome als auch MT4-MMP auf Mammakarzinomzellen [16, 45, 58, 88].

#### Zellmigration:

Wie zuvor beschrieben, wären ohne die pro-migratorischen Fähigkeiten der MT-MMP die Knochenentwicklung, Gewebemorphogenese und Angiogenese nicht oder nur eingeschränkt möglich. Die pro-migratorischen Fähigkeiten der MT-MMP konnte sowohl für epitheliale, als auch mesenchymale und neuronale Zellen sowie Trophoblasten gezeigt werden [17, 51, 57-58, 117]. Belien et al. konnten zudem nachweisen, dass die Expression von MT1-MMP die Migration von Fibroblasten im ZNS fördert [6].

#### **3.2.7 Expression im normalen Gehirn und Astrozytomen**

Normalerweise werden nur MT3-, MT4- und MT5-MMP im Gehirn exprimiert [64, 83, 89, 120, 160], MT6-MMP dagegen nicht [115, 160] [115, 160]. Die Literaturangaben zur Expression des MT1-MMP und MT2-MMP sind unterschiedlich [110, 132, 149, 166].

In der folgenden Tabelle ist die mRNA-Expression von MT-MMPs in Astrozytomen dargestellt. Der Schweregrad des Astrozytoms korreliert hierbei mit der Expressionsstärke des MT1-, MT2- und MT6-MMP [77, 104, 106], wohingegen es keine Korrelation mit der Expressionshöhe des MT3-MMP gibt [104]. Zu MT4- und MT5-MMP liegen keine Daten vor. Nuttall et al. bestätigten zudem die Expression aller MT-MMP in Astrozytomen [106].

MT-MMP/ Expression in	Diffuse Astrozytome	Anaplastische Astrozytome	Glioblastom
MT1-MMP	0/9	2/9	17/17
MT2-MMP	0/9	2/9	12/17
MT3-MMP	6/9	4/9	12/17
MT4-MMP	1/5	1/4	4/7
MT5-MMP	2/5	2/4	2/7
MT6-MMP	0/5	2/4	1/7

**Tab. 3.7: Expressionsmuster der MT-MMP in den Astrozytomentitäten**

[34, 77, 83, 104, 160]

Die Expression von MT1-, MT2- und MT3-MMP wurde durch Nakada et al. [104], die von MT4- und MT6-MMP durch Velasco et al. [160] und die von MT5-MMP durch Llano et al. [83] untersucht. Die Angabe 17/17 bedeutet, dass in 17 von 17 Tumorproben eine Expression von MT-MMPs detektiert werden konnte.

### 3.3 Zielsetzung dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollte der individuelle Einfluss der 6 MT-MMPs auf die Astrozytenmigration untersucht werden, um so eine mögliche Bedeutung für die Astrozytomprogression zu evaluieren. Zur Expression der MT-MMP wurden primäre murine Tp53-defiziente Astrozyten retroviral mit den entsprechenden Expressionsvektoren infiziert. Die Migrationsfähigkeit der MT-MMP-exprimierenden Astrozyten wurde in mehreren etablierten sowie einem neuartigen Migrationsassay analysiert. Anhand der Ergebnisse könnten neue therapeutische Ansätze abgeleitet werden, um so die Prognose der Astrozytome zu verbessern

## 4. Material und Methoden

### 4.1 DNA-Techniken

Um die humanen MT-MMPs in den Astrozyten zu exprimieren, mussten die humanen *mt-mmp cDNAs* in einen geeigneten Expressionsvektor kloniert werden.

Die sechs *mt-mmp cDNAs* wurden freundlicherweise von M. Seiki (Tokyo, Japan) zur Verfügung gestellt. Die *mt-mmp cDNAs* mussten aus dem Vektor pSG-5 zunächst durch Restriktionsenzyme ausgeschnitten und in den retroviralen Expressionsvektor MIGR-I (Addgene, Cambridge, USA) kloniert werden (s. Abb. 4.1). Die *mt-mmps* waren mittels der im Kapitel 4.1.2 beschriebenen Restriktionsendonukleasen in die *multiple cloning site* des pSG-5-Vektor (Kap. 7.4) durch M. Seiki kloniert worden. Da der MIGR-I-Vektor nicht für alle *mt-mmps* die passenden Schnittstellen in der MCS enthielt, musste für die Klonierung des *mt4-*, *mt5-* und *mt6-mmp* eine neue MCS erstellt werden. Der neue Vektor wurde als MIGR-II bezeichnet.

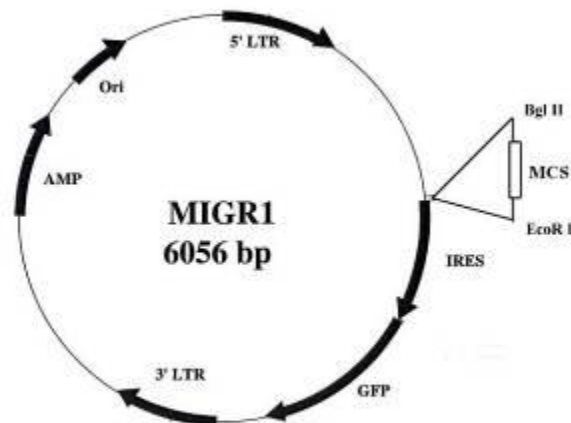
Zur Amplifikation der *mt-mmp cDNA* im MIGR-I- und MIGR-II wurden die Plasmide in kompetente Bakterien transformiert. Dort wurde das Plasmid amplifiziert und anschließend in einer Mini-Präparation aus den Bakterien aufgereinigt. Über einen Verdau mit Restriktionsenzymen und der Anfertigung eines Agarose-Gels konnte die erfolgreiche Insertion bestätigt werden.

War die *mt-mmp cDNA* im MIGR-I- und MIGR-II-Vektor nachweisbar, folgte eine Maxi-Präparation. Mit dieser Präparation konnten größere Mengen Plasmid aufgereinigt werden, die für die Transfektion in die Verpackungszelllinie Phoenix-ECO benötigt wurden.

Um sicherzustellen, dass nur die mit den MIGR-Vektoren transformierten Bakterien auf den Agarplatten sowie auch in den Bakterienkulturansätze für die Mini- und Maxipräparation sich vermehrten, wurden zum Agar und zu den Bakterienkulturansätzen Ampicillin hinzugegeben. Dies gewährleistete das selektive Wachstum der Bakterien mit integrierten MIGR-Vektoren, da der MIGR-Vektor eine Ampicillin-Resistenz enthielt.

Bei den MIGR-I und MIGR-II-Vektoren handelt es sich um retrovirale Expressionsvektoren, in die zwischen den LTR-Sequenzen beliebige cDNAs

einkloniert werden können. Zudem enthält der Vektor ein GFP-Gen, welches bei Ablesen des Gens zur Bildung von GFP-Protein führt, sodass die Zellen grün fluoreszieren. (Abb. 4.1). Mit diesem Konstrukt wurden ekotrophen Phoenixzellen transfiziert, die als Verpackungszelllinie fungieren und ein replikationsdefizientes Virus produzieren. Nach Infektion von primären murinen Tp53-defizienten Astrozyten wurde die einklonierte cDNA in das Genom der Zielzellen integriert und exprimiert.



#### Abb. 4.1: MIGR-I

5'- und 3'-LTR= *long terminal repeat*: Flankiert das abzulesende Gen und das *gfp* und sorgt für die Transposition in das Retrovirus.

AMP= Ampicillin-Resistenz: Sie ist für die Selektion der Bakterien mit enthaltenem Vektor entscheidend.

GFP= *green fluorescence protein*-Gen (grün fluoreszierendes Protein)

IRES= *internal ribosomal encoding site* (interne ribosomale Eintrittsstelle): Ermöglicht die Cap-unabhängige Translation von mRNA.

MCS= *multiple cloning site*: In diese Stelle wurde die *mt-mmp* cDNA kloniert.

ORI= *origin of replication* (Replikationsursprung).

#### 4.1.1 Klonierung des MIGR-II

Die *mt4-mt6-mmp* cDNAs sollten aus dem Vektor pSG-5 mit EcoRI und einem weiteren Enzym ausgeschnitten werden. Für die Klonierung des MIGR-II-Vektors wurde der MIGR-I-Vektor verwendet. Die EcoRI-Schnittstelle lag im Vektor pSG-5 vor dem Beginn der *mt-mmp* cDNA. Da die EcoRI-Schnittstelle in der MCS des MIGR-I-Vektors am Ende liegt, hätte dies bedeutet, dass die *mt4-mt6-mmp* cDNAs in der falschen Richtung hineinligiert worden wären. Der cDNA-Anfang hätte also entgegen der

Ableserichtung des Vektors gelegen.

Die folgenden Abbildungen (4.2 und 4.3) zeigen die MCS-Sequenz des MIGR-I- bzw. MIGR-II-Vektors. Der Unterschied in diesen beiden Vektoren besteht in der BglII-Schnittstelle, die beim MIGR-II-Vektor defekt ist, und in der EcoRI-Schnittstelle, die sich beim MIGR-I-Vektor nach der XhoI-Schnittstelle, beim MIGR-II-Vektor vor der XhoI-Schnittstelle befindet.

```

XhoI   BstBI   PmeI       NotI       BamHI   HpaI   EcoRI
5'                                     3'
TCGAGTT | CGAAGTTT | AAACGC | GGCCGCG | GATCCGTT | AACG
      CAAGC | TTCAAA | TTTGCGCCGG | CGCCTAG | GCAA | TTGCTTAA
3'                                     5'

```

**Abb. 4.2: MCS-Sequenz des MIGR-I-Vektors**

```

BglII  EcoRI  BstBI  XhoI   PmeI       NotI   BamHI   HpaI
(defekt)
5'                                     3'
GA | TCG | AATTC | GAAC | TCGAGGTTT | AAACGC | GGCCGCG | GATCCGTT | AAC |
      CTTAA | GC | TTGAGCT | CCAAA | TTTGCGCCGG | CGCCTAG | GCAA | TTGCTTAA |
3'                                     5'

```

**Abb. 4.3: MCS-Sequenz des neuen MIGR-II-Vektors**

Für die Klonierung wurde der MIGR-I-Vektor mit BglII und EcoRI verdaut. Anschließend wurde die verdaut DNA des MIGR-I-Vektors auf ein 1 %iges TAE-Agarose-Gel aufgetragen und bei 120 V für 30 Minuten aufgetrennt. Die Gelbande des verdauten MIGR-I-Vektors wurde mit einer Rasierklinge ausgeschnitten. Nach Überführung der Gelbande in ein Eppendorf-Gefäß wurde gemäß dem Qiagen-Protokoll zur Gel-Extraktion aus dem QIAquick Gel Extraction Kit verfahren.

Die aus der Gelbande extrahierte MIGR-I-Vektor-DNA wurde mit der T4-DNA-Ligase in einem Verhältnis von 1:3 mit Oligonukleotiden (s. 7.1.1) (berechnet nach der Formel:  $(ng_{\text{Vektor}} \times kb(\text{Kilobasen})_{\text{Insert}}) / (kb_{\text{Vektor}} \times \text{molares Verhältnis}_{\text{Vektor/Insert}}) = ng_{\text{Insert}}$ ) gemäß dem Promega-Protokoll ligiert. Der ligierte MIGR-II-Vektor wurde dann in *E. coli* Bakterien transformiert und mittels Mini-Präparation aufgereinigt. Um die richtige Klonierung zu überprüfen, wurde der neue MIGR-II-Vektor mit BglII inkubiert. Die DNA aus dem Kontrollverdau wurde anschließend auf einem 1 %igen TAE-Agarose-Gel mit Ethidiumbromid aufgetrennt und die DNA-Banden durch Anregung des Ethidiumbromids mit einer UV-Lampe sichtbar gemacht.

<b>TAE 25x:</b>	EDTA 0,5 M	25 ml
	Essigsäure	12,875 ml
	Tris	60,5 gr
<b>TAE-Gel (1%)</b>	TAE 1x	50 ml
	Agarose	0,5 g
	Ethidiumbromid 1 %	4 µl

Tab. 4.1: TAE-Gel

#### 4.1.2 Klonierung der *mt-mmp cDNAs* in den MIGR-I- und MIGR-II-Vektor

Die *mt-mmp cDNAs* wurden mittels Restriktionsendonukleasen aus dem Vektor pSG-5 ausgeschnitten. Bei *mt1-* und *mt2-mmp* handelte es sich um die Restriktionsendonuklease EcoRI, bei *mt3-mmp* um BglII, bei *mt4-mmp* um EcoRI/NotI, bei *mt5-mmp* um EcoRI/XhoI und bei *mt6-mmp* um EcoRI/BamHI. Die MIGR-I- und MIGR-II-Vektoren wurden mit den gleichen Enzymen für das jeweilige *mt-mmp* geschnitten.

Das Ausschneiden, wie bei *mt1-*, *mt2-* und *mt3-mmp* durchgeführt, vor Beginn und nach Ende des Gens nennt man ungerichtetes Schneiden, da die Gene in zwei Richtungen in einen Vektor eingebaut werden können. Bei diesem Schneiden entstehen zwei zueinander komplementäre Überhänge. Um zu verhindern, dass die DNA oder der MIGR-I- und MIGR-II-Vektor religierten, wurden diese Überhänge während des DNA-Verdaus mit der *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) dephosphoryliert. Die Menge der DNA der *mt-mmps* und des MIGR-I- und MIGR-II-Vektors betrug 1 µg und die Ansätze wurden gemäß dem empfohlenen Fermentas-Protokoll pipettiert.

Nach dem Verdau des pSG-5-Vektors und des MIGR-I- und MIGR-II-Vektors wurde die DNA auf einem 1 %igen Agarose-TAE-Gel aufgetragen und die Gelbande der *mt-mmp cDNA* sowie die MIGR-I und MIGR-II-Vektor-DNA ausgeschnitten. Nach der DNA-Extraktion aus den Gelstücken erfolgte die Ligation der *mt-mmp cDNA* mit dem MIGR-I- und MIGR-II-Vektor.

Die geschnittene Vektor-DNA und die *mt-mmp cDNA* wurden mit der T4-DNA-Ligase in Verhältnis Vektor:Gen von 1:7,5 nach dem Promega-Protokoll ligiert. Dieses Verhältnis wurde nach folgender Formel berechnet:  $(\text{ng}_{\text{Vektor}} \times \text{kb}_{\text{Insert}}) / (\text{kb}_{\text{Vektor}} \times$



molaes Verhältnis $_{\text{Vektor/Insert}} = \text{ng}_{\text{Insert}}$ . Die *mt-mmp cDNA* und die MIGR-I- und MIGR-II-Vektor-DNA wurden daraufhin in elektrokompente Bakterien transformiert und mittels Mini-Präparation aufgereinigt.

#### 4.1.3 Transformation der ligierten DNA

Die Transformation diente dem Einschleusen von Fremd-DNA in kompetente Bakterien, wobei dies chemisch oder elektrisch durchgeführt wurde. Da die Transformationseffizienz der chemischen Variante nicht hoch genug war, wurde die sogenannte Elektroporation verwendet. Bei der Elektroporation wurde eine hohe Spannung an die Suspension aus Bakterien und DNA angelegt, sodass Poren in den Bakterien entstanden, durch die die DNA eindringen konnte.

Für die Transformation wurden elektrokompente Bakterien (XL2-Blue MRF' ultracompetent Cells von Stratagene, Santa Clara) verwendet. Dafür wurde der Ligationsansatz von 20 µl auf 50 µl mit Aqua dest. aufgefüllt und die T4-DNA-Ligase bei 65°C im Wasserbad für 10 Min. denaturiert. Zu diesem Ansatz wurden 500 µl N-Butanol gegeben, anschließend gut geschüttelt und danach 15 Min. bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Mit einer Pipette wurde das N-Butanol abgenommen und die Pellets im Thermoblock bei 37°C solange getrocknet, bis die Geruchsprobe N-Butanol-negativ war. Das DNA-Pellet wurde in 20 µl Aqua dest. resuspendiert. 4 µl davon wurden als Tropfen an die Wand einer Transformationsküvette gegeben, mit 40 µl Bakteriensuspension gemischt und das Gemisch anschließend auf den Boden der Küvette geklopft.

<b>LB-Medium:</b>	Luria Broth Base	25 gr
	H <sub>2</sub> O	Bis auf 1 Liter

**Tab. 4.2: LB-Medium**

Nach der Elektroporation wurden 900 µl kaltes *Luria Broth Base*-Medium (LB-Medium) hinzugegeben, die Küvette gespült und die Lösung in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 37°C und 1400 rpm im Thermomixer.

Danach wurde die Lösung bei 5000 rpm und Raumtemperatur (RT) 5 Min. zentrifugiert und 850 µl des Überstandes abgenommen. Das Pellet wurde in dem restlichen LB-Medium gelöst und auf eine Agar-Platte pipettiert. Die Agar-Platte wurde 15 Std. bei

37°C im Brutschrank inkubiert.

#### 4.1.4 Mini-Präparation

Für den Bakterienkulturansatz wurden einzelne Bakterienkolonien mit einer sterilen Pipettenspitze von den Agar-Platten gepickt und in 5 ml LB-Medium mit 20 µl Ampicillin (100 mg/ml) angezüchtet. Die Mini-Präparation erfolgte nach folgendem Protokoll:

Durchführung
1. Inkubation der gepickten Bakterienkolonie in LB-Medium (0,4 mg Ampicillin/ ml) im Schüttler für 15 Std. bei 37°C und 300 rpm
2. Abnahme von 1 ml der Kultur und Zentrifugation für 5 Min.
3. Absaugen des Überstandes und Lösen des Pellets in 300 µl Puffer P1*
4. Zugabe von 300 µl Puffer P2** und sechsmaliges Invertieren der Probe
5. Inkubation für 5 Min. bei Raumtemperatur (RT)
6. Zugabe von 300 µl Puffer P3*** und Inkubation für 5 Min. auf Eis
7. Zentrifugation für 15 Min. bei 14000 rpm und 4°C
8. Überführung des Überstandes in ein neues Eppendorf-Gefäß und Hinzufügen von 600 µl Isopropanol
9. Schütteln der Lösung
10. Fällung für 30 Min. bei -80°C
11. Zentrifugation für 10 Min. bei 14000 rpm und 4°C
12. Absaugen des Überstandes und Waschen des Pellets mit 300 µl 80 %igem Ethanol
13. Zentrifugation für 10 Min. bei 14000 rpm und 4°C
14. Abnahme des Überstandes und Trocknung des Pellets bei 37°C im Thermomixer
15. Aufnahme des Pellets in 26 µl 10 mM Tris pH 8,35 und Lösen für 10 Min. bei 37°C im Thermomixer

**Tab. 4.3: Mini-Präparation**

<b>*P1:</b>	EDTA (0,5 M, pH 8,0)	5 ml
	RNase A (5 mg/ml)	1 ml
	Tris Base (1 M, pH 8,0)	2,5 ml
	H <sub>2</sub> O	Bis auf 50 ml
<b>**P2:</b>	10 %iges SDS	5 ml
	Natriumhydroxid (2 M)	5 ml
	H <sub>2</sub> O	Bis auf 50 ml
<b>***P3:</b>	Essigsäure	5,5 ml
	Kaliumacetat	14,72 gr
	H <sub>2</sub> O	Bis auf 50 ml

Tab. 4.4: P1-3 Lösungen

#### 4.1.5 Überprüfung der Proben

Um festzustellen, ob die Ligation erfolgreich war, wurde die Mini-Präparation von *mt4*-, *mt5*- und *mt6-mmp* mit den jeweiligen Enzymen geschnitten, die auch bei der Klonierung verwendet wurden, und auf ein 1 %iges SB (*sodium borate*)-Gel aufgetragen.

Bei *mt1*- und *mt2-mmp* musste wegen der ungerichteten Klonierung der Mini-Präparationsansatz mit BglIII asymmetrisch geschnitten werden, um anhand der Länge des ausgeschnittenen Insertfragmentes die in der korrekten Richtung eingebauten Klone zu identifizieren. Bei *mt3-mmp* erfolgte dies mit EcoRI.

<b>SB 20x:</b>	Disodiumboratedecahydrat	38,137 gr
	H <sub>2</sub> O	950 ml
	Borsäure	pH auf 8,0
<b>SB-Gel (1%)</b>	SB 1x (50 ml 20x SB in 1 Liter H <sub>2</sub> O)	100 ml
	Agarose	1 gr
	Ethidiumbromid 1 %	8 µl

Tab. 4.5: SB-Gel

#### 4.1.6 Schnelltransformation

Da mit den elektrokompenten Bakterien nach mehreren Versuchen keine verwertbaren DNA-Mengen bei der Maxi-Präparation gewonnen werden konnten, musste als

Zwischenschritt eine Schnelltransformation mit chemokompetenten Bakterien (E. Coli) durchgeführt werden.

5 µl von chemokompetenten E. Coli-Bakterien wurden mit 1 µl einer Mini-Präparation gemischt und 45 Sekunden bei 42°C im Thermomixer inkubiert. Danach folgte eine Inkubation auf Eis von 1 Minute. Anschließend wurde die Bakteriensuspension in 80 µl LB-Medium aufgenommen, ausplattiert und im Brutschrank 15 Stunden bei 37°C inkubiert.

### 4.1.7 Maxi-Präparation

Der Bakterienkulturansatz erfolgte mit einer Kolonie aus der Schnelltransformation in 200 ml LB-Medium mit 800 µl Ampicillin (100 mg/ml). Dieser Ansatz wurde 16 Std. bei 37°C und 300 rpm inkubiert.

Bei der Maxi-Präparation wurde gemäß dem Qiagen-Protokoll aus dem Qiagen Plasmid Maxi Kit verfahren.

Nach der Maxi-Präparation wurde die Identität der klonierten Inserts im MIGR-I- und MIGR-II-Vektor durch Sequenzierung (Agowa (Berlin)) verifiziert. Die verwendeten Primer sind in Kapitel 7.1.2 aufgelistet.

### 4.1.8 Genotypisierung der Tp53<sup>-/-</sup>-Mauslinie

Zur Identifikation der Astrozyten aus homozygoten Tp53<sup>-/-</sup>-Mäusen, wurde die DNA aus den Schwanzspitzen von insgesamt 15 neonatalen Mäusen isoliert und mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt, um den Genotyp zu ermitteln. Da heterozygote Tp53-Astrozyten noch eine Restfunktion des Tp53-Proteins aufweisen, war die Feststellung des Genotyps wichtig [169].

In der PCR kamen zwei Primerpaare zum Einsatz, mit denen einerseits das Wildtyp-Allel der Größe 310 bp und andererseits die *knockout*-Bande der Größe 451 bp amplifiziert wurden (siehe unten).

In der folgenden Tabelle ist die DNA-Isolierung aus dem Mausschwanz zusammengefasst:

Durchführung
1. Verdau der Mäuseschwänze mit 500 µl Lysepuffer (0,2 M NaCl, 0,1 M Tris (pH 8,35), 0,5 mM EDTA, 0,2 % SDS, 5 µl Proteinase K und ad 500 ml H <sub>2</sub> O) über Nacht bei 37°C
2. Zugabe von 500 µl Phenol/Chloroform, Schütteln des Gemisches und Zentrifugation für 10 Minuten bei RT und 14000 rpm
3. Abnahme des Überstandes und Hinzugabe von 100 % Ethanol
4. Fällung für 20 Min. bei -80°C
5. Zentrifugation für 10 Min. bei 4°C und 14000 rpm
6. Absaugen des Überstandes und Waschen des Pellets in 80 %igem Ethanol
7. Erneute Zentrifugation und Abnahme des Überstandes
8. Trocknen des Pellets und Lösen in 200 µl 10 mM Tris pH 8,35

**Tab. 4.6: DNA-Isolierung (PCR)**

Die DNA aus den Schwanzspitzen der Versuchstiere wurde in einer PCR amplifiziert und auf das Vorhandensein des Wildtyp- oder *knockout*-Allels untersucht.

Für die Genotypisierung wurden folgende Oligonukleotide als Primer von Aparabioscience, Denzlingen, verwendet:

Primer	Bindungsort	Sequenz
107_Trp53wt_s	5′	5′-CGGGAAATAGAGACGCTGAGTCCG-3′
108_PGKpolyA_p53KO_s	5′	5′-GGTGGGGTGGGATTAGATAAATGCC-3′
109_Trp53_a	5′	5′AGTGTGATGATGGTAAGGATAGGTCCGC-3′

**Tab. 4.7: PCR-Primer**

Das Wildtypallel wird von den Primern „107\_Trp53wt\_s“ und „109\_Trp53\_as“ (310 Basenpaare) und das Trp53-Allel von den Primern „108\_PGKpolyA\_p53KO\_s“ und „109\_Trp53\_a“ (*knockout* Bande: (451 Basenpaare)) amplifiziert.

Der PCR-Ansatz wurde wie folgt auf Eis pipettiert:

Reagenz	Volumen
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 µl
dNTP's	0,5 µl
Primer 107	0,44 µl
Primer 108	0,29 µl
Primer 109	0,73 µl
50 %iges DMSO	1 µl
Go Taq Hot Start Polymerase	1 µl
DNA	1 µl

**Tab. 4.8: PCR-Ansatz**

Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler nach folgendem Programm:

Zyklenanzahl	Dauer	Temperatur	Vorgang
1	2 Min.	94°C	Primäre Denaturierung der DNA
33	20 Sek.	94°C	Denaturierung der DNA
	30 Sek.	58°C	Anlagerung der Oligo-Primer an die DNA-Matrize
	45 Sek.	72°C	Verlängerung der Primer durch DNA-Polymerase
1	10 Min.	72°C	Elongation am Ende
	∞	4°C	Pause

**Tab. 4.9: PCR-Zyklus**

Nach der PCR der DNA aus den Mäuseschwänzen, wurde die DNA elektrophoretisch auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt und durch Anregung des Ethidiumbromids mit einer UV-Lampe sichtbar gemacht.

## 4.2 Zellkultur-Techniken

Nach der Präparation der retroviralen Expressionsvektoren wurden mithilfe der Verpackungszelllinie Phoenix-ECO Retroviren hergestellt, die die *mt-mmp cDNAs* in das Genom der Zielzelle inserieren. Es handelte sich dabei um eine Calcium-Chlorid Transfektion, bei der ein Überschuss an Calcium-Ionen die Durchlässigkeit der Zellmembran erhöhte und damit das Einschleusen der Expressionsvektoren (MIGR-I und MIGR-II) in die Phoenixzelle ermöglichte.

Mit diesen Retroviren wurden murine Astrozyten auf einem genetischen C57 BL/6 und Tp53<sup>-/-</sup> Hintergrund infiziert. Die MT-MMP exprimierenden Astrozyten konnten daraufhin für die Invasions- und Migrationsassays verwendet werden.

Um die Phoenixzellen und die Astrozyten auf der Kulturschale beurteilen zu können, wurden diese unter dem Leica CTR-6000 oder Leica DMI 6000 B im Phasenkontrastmodus oder unter Fluoreszenz betrachtet. Da die Phoenixzellen und Astrozyten einen geringen Eigenkontrast aufwiesen, war es mit dem Phasenkontrastmodus möglich, diese ausreichend sichtbar zu machen.

#### 4.2.1 Transfektion der Phoenixzellen

Die Phoenixzell-Aliquots wurden bei 37°C aufgetaut und zu 7 ml kaltem Kulturmedium in ein Zentrifugen-Röhrchen gegeben. Danach wurden die Phoenixzellen im Kulturmedium für 5 Minuten bei 1300 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, die Zellen in 10 ml frischem Kulturmedium aufgenommen und auf einer Zellkulturschale ausplattiert. Der Erfolg der Transfektion konnte anhand der GFP-Expression der Phoenixzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop überprüft werden. Die Transfektion ist in Tab. 4.5 beschrieben.

Durchführung
1. 24 Stunden vor Transfektion: Aussäen von 4 Millionen Phoenixzellen auf einer Zellkulturschale
2. Erstellung des Transfektionsansatzes: Tropfenweise Zugabe von Ansatz B (1ml) zu Ansatz A (1 ml) unter Vortexen von Ansatz A
3. Transfektion: Zugabe des Transfektionsansatzes aus Schritt 2 Tropfen für Tropfen auf die Phoenix-Zellen
4. 15 Std. nach Transfektion: Mediumwechsel mit 7 ml frischem Kulturmedium und Überprüfung der Transfektionseffizienz anhand der GFP-Fluoreszenz
5. 48 Std. nach Transfektion: Ernten von zweimal 3 ml des Virus, Sterilfiltration in ein steriles 10 ml-Gefäß und Einfrieren des Virenüberstandes in flüssigem Stickstoff (Lagerung bei -80 °C)
6. Erneute Zugabe von 7 ml Kulturmedium auf die Phoenixzellen
7. 66 Std. nach Transfektion: Zweite Virusernte wie in Schritt 5

**Tab. 4.10: Transfektion der Phoenixzellen**

<b>Kulturmedium</b>	DMEM-Glutamax	500 ml
	Fetal Bovine Serum	50 ml
	Penicillin/Streptomycin	5 ml
<b>Ansatz A (pH 7,05)</b>	H <sub>2</sub> O	40 ml
	HEPES (1 M)	2,5 ml (50 mM)
	Natriumchlorid (5 M)	2,8 ml (280 mM)
	Natriumhydrogenphosphat (1 M)	75 µl (1,5 mM)
<b>Ansatz B</b>	Calciumchlorid (2,5 M)	100 µl (250 mM)
	H <sub>2</sub> O	860 µl
	Plasmid-DNA (1 µg/µl)	40 µl

**Tab. 4.11: Kulturmedium und Transfektionsansätze**

#### 4.2.2 Präparation der Astrozyten

Für die Isolation der primären Astrozyten wurden Gehirne von 0 - 2 Tage alten Mäusen genutzt. Die neonatalen Mäuse wurden mit Isofluran betäubt, ihr Kopf mit Ethanol desinfiziert und anschließend mit einer Schere in der Mitte des Halses abgetrennt. Zusätzlich wurde ein Teil des Schwanzes für die Genotypisierung abgenommen.

Zur Präparation des Gehirns wurde am abgetrennten Kopf die Kopfhaut mit einer Schere von kaudal nach rostral eröffnet und mit einer zweiten sterilen Schere vom Foramen magnum aus das Schädeldach abgehoben.

Das Gehirn wurde mit einem sterilen Spatel entnommen und in eine kleine Petrischale mit eiskaltem HBSS gehoben. Dann wurde das Gehirn mit einem sterilen Skalpell zerkleinert und anschließend mit 600 µl Trypsin-Lösung durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Die Trypsin-Lösung enthielt Trypsin, welches die Zellen voneinander trennte.

<b>Trypsin-Lösung</b>	TD (6 ml 2,5 % Trypsin + 750 µl 1% DNase I)	300 µl
	HBSS	Bis auf 4,5 ml

**Tab. 4.12: Trypsin-Lösung**

Im Brutschrank erfolgte bei 37°C für 8 Minuten der Trypsinverdau des Hirngewebes. Im Anschluss wurde die Trypsinisierung (0,05 % Trypsin/EDTA) mit 4 ml Kulturmedium gestoppt.

Nach 5 Min. Zentrifugation bei RT und 1300 g wurde der Überstand abgesaugt, das



Zellpellet in 1 ml Triturationslösung resuspendiert und 5 Min. bei RT inkubiert.

<b>Triturationslösung</b>	DNase I (10 mg/ml)	80 µl
	DPBS	Bis auf 8 ml

**Tab. 4.13: Triturationslösung**

Anschließend wurde wieder 5 Min. bei RT und 1300 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml Kulturmedium resuspendiert.

Die Zellsuspension wurde in eine Kulturschale gegeben und bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Nach 2 Tagen wurde die Astrozytenprimärkultur vorsichtig mit DPBS gewaschen und das Kulturmedium erneuert.

Alle 3 Tage erfolgte nun ein Kulturmediumwechsel, nach einer Woche erreichten die Zellen Konfluenz und konnten auf zwei Kulturschalen aufgeteilt werden.

#### **4.2.3 Transduktion der Tp53<sup>-/-</sup>-Astrozyten**

Die Transduktion der murinen Tp53-defizienten Astrozytenprimärkulturen erfolgte mittels retroviraler Infektion. Es wurden Astrozytenkulturen verwendet, die eine Konfluenz von 70 % aufwiesen. Dazu wurde ein 3 ml-Virus-Aliquot im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Währenddessen wurde die Astrozytenkultur mit DPBS gewaschen und 2 ml Kulturmedium mit 80 µg/ml Polybrene zugegeben. Nach Auftauen des Virus wurde dieses ebenfalls zu der Astrozytenkultur gegeben. Nach 15 Std. wurde 5 ml frisches Kulturmedium hinzugefügt, 48 Std. später erfolgte die Beurteilung der Transfektionseffizienz anhand der GFP-Fluoreszenz.

Drei unabhängige Astrozytenkulturen wurden jeweils mit einem der sechs *mt-mmps* transduziert, zur Kontrolle wurde zudem nur mit dem MIGR-II-Vektor, dem Kontrollvektor, transfiziert. So entstanden drei Zellreihen A1-A3.

### **4.3 RNA-Nachweis der humanen und murinen MT-MMP**

Um die Expression der MT-MMP nachzuweisen, wurde als erstes ein Nachweis auf RNA-Ebene durchgeführt. Da man sich nicht sicher sein kann, dass die *mt-mmp cDNA* in die RNA der MT-MMP umgeschrieben wird, wurde dieser Nachweis vor dem Western-Blot erbracht.

#### 4.3.1 RNA-Extraktion aus Astrozyten

Astrozyten auf einer vollbewachsenen Kulturschale wurden mit einem Zellschaber von der Zellkulturschalenoberfläche abgekratzt, in Kulturmedium gelöst und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. In diesem wurden sie für 5 Min. bei RT und 1300 rpm zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen zweimal mit DPBS gewaschen. Die weiteren Schritte sind tabellarisch aufgeführt:

Durchführung
1. Zellen in 0,5 ml Trizol aufnehmen und mit Turrax-Homogenisator homogenisieren
2. 5 Min. Inkubation bei RT
3. Zugabe von 0,2 ml Chloroform
4. 15 Sek. kräftiges Schütteln
5. Inkubation für 2-3 Min. bei RT
6. Zentrifugation für 15 Min. bei 4°C und 12000 g
7. Abnahme der obersten (RNA) der drei entstandenden Phasen
8. Zugabe von 250 µl Isopropanol und kurzes Schütteln
9. Inkubation für 10 Min. bei RT
10. Zentrifugation für 10 Min. bei 4°C und 12000 g
11. Abnahme des Überstands und Waschen des RNA-Pellets mit 500 µl 75 %igem Ethanol
12. Zentrifugation für 5 Min bei 4°C und 7500 g
13. Trocknung des Pellets, Aufnahme in TE-Puffer und photometrische Bestimmung der RNA-Menge

**Tab. 4.14: RNA-Extraktion**

#### 4.3.2 RNase-Protection-Assay (RPA)

Zur quantitativen Messung der RNA-Expression wurde der RNase-Protection-Assay durchgeführt, bei dem mit einem Überschuss radioaktiv markierter Einzelstrang-RNA

(*Antisense*-Sonde) die nachzuweisende RNA hybridisiert wurde. Die RNA, die nicht hybridisiert wurde, wurde durch zwei RNasen, die nur einsträngige RNA verdauen, (s. 4.2.3.2) abgebaut

Nach der Hybridisierung wurden die denaturierten Proben in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und die radioaktive RNA durch Autoradiographie detektiert.

#### 4.3.2.1 Synthetisieren der Sonde, Szintillationsmessung und Hybridisierung

Der erste Schritt zur Herstellung der Sonde bestand darin, dass durch die T7-Polymerase, ausgehend vom T7-Promoter der Plasmide im Sondenst, eine Sonde bis zur EcoRI-Schnittstelle synthetisiert wurde. Die synthetisierte RNA war folglich komplementär zur nachzuweisenden mRNA, mit welcher Hybride gebildet werden konnten.

Folgender Ansatz wurde auf Eis zusammenpipettiert:

Reagenz	Volumen und Molarität
H <sub>2</sub> O	5 µl
5x Transkriptionspuffer	4 µl
DTT (100 mM)	2 µl
DNTP's	1 µl (2,5 mM GTP, ATP und CTP, 30µM UTP)
Template Sondenst (15 ng/Template)	1 µl
<sup>32</sup> P-UTP	5 µl
RNA Guard (27 U/µl)	1,5 µl
T7-Polymerase (10 U)	1 µl

**Tab. 4.15: RPA-Reagenzmischung**

Nach dem Mischen durch Auf- und Abpipettieren wurde der Ansatz eine Stunde bei 37°C inkubiert, danach 7 µl H<sub>2</sub>O, 2 µl 10x DNase Puffer sowie 1 µl DNase I hinzugefügt und kurz geschüttelt. Dies diente zum Verdau der zuvor dazugegeben DNA-Templates aus dem Sondenst.

Anschließend erfolgte eine 30 minütige Inkubation bei 37°C. Daraufhin wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit 29 µl 20 mM EDTA (pH 8) und 70 µl Tris-gesättigtem Phenol/Chloroform (1:1) durchgeführt. Das Probenröhrchen wurde für 30 Sek. geschüttelt, dann wurde die Probe zur Fällung der RNA für 5 Min. bei RT und

14000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und zur Präzipitation der RNA in 750 µl Präzipitationsmix überführt.

<b>Präzipitationsmix</b>	Ammoniumacetat (5 M)	1,92 ml (190 mM)
	Ethanol (100 %)	48 ml (96 %)
	tRNA	80 µl (16 µg/ml)

**Tab. 4.16: Präzipitationsmix**

Die Proben wurden erneut für 20 Sek. geschüttelt, für 1 Std. auf Trockeneis gestellt und dann 30 Min. bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert.

Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, woraufhin eine Fällung mit 100 µl 80 %igem Ethanol folgte. Nach einer Zentrifugation von 10 Min. bei 4°C und 14000 rpm wurde der Überstand abgesaugt und 20 µl Hybridisierungspuffer hinzugefügt. Der 5x Hybridisierungspuffer wurde zuvor mit Formamid im Verhältnis 1:4 gemischt.

<b>1 x Hybridisierungspuffer</b>	EDTA	1 mM
	Natriumchlorid	400 mM
	PIPES (pH 6,4)	40 mM

**Tab. 4.17: 1x Hybridisierungspuffer**

Zur Szintillationsmessung wurden 1 µl von jeder Probe 1:10 und 1:100 im Hybridisierungspuffer verdünnt und dann jeweils 1 µl der beiden Verdünnungen im Szintillationsmesser gemessen. Es wurde so stark verdünnt, bis die Sonde 500 DPM/µl/UTP-Rest im Sondenmix hatte. Im Anschluss wurde das Volumen der Sonde errechnet und mit 10 µl Hybridisierungspuffer pro Probe gemischt. Diese Lösung wurde als *working dilution* bezeichnet. Nun folgte die Hybridisierung der Sonde. 5 µg der RNA-Probe wurden in einem 0,5 ml Eppendorfgefäß vorgelegt und dazu 10 µl *working dilution* gegeben. Nach Schütteln und Abzentrifugieren wurden die Proben über Nacht im Thermocycler bei 52°C hybridisiert.

#### 4.3.2.2 Präparation der Proben für den Gel-Lauf

Am zweiten Tag folgte der RNase-Verdau, bei dem die nicht-hybridisierte Einzelstrang-RNA für 45 Min. bei 32°C verdaut wurde. Hierfür wurde zu jedem Hybridisierungsansatz 100 µl RNase-Mix gegeben.

<b>RNase-Mix</b>	RNase A (100 µg/ml)	5 µl
	RNase Puffer	2,5 ml
	RNase T1 (125 U/µl)	1 µl
<b>RNase-Puffer</b>	EDTA (0,5 M, pH 8,0)	5 ml (5 mM)
	Natriumchlorid (5 M)	30 ml (0,3 M)
	Tris Base (1 M, pH 7,5)	5 ml (0,01 M)
	H <sub>2</sub> O	460 ml

**Tab. 4.18: RNase-Mix und -Puffer**

Um wiederum die RNasen aus der Lösung zu entfernen, wurden diese durch Proteinase K inaktiviert. Auf jede Probe wurden 18 µl Proteinase-K-Verdau-Mix gegeben und für 30 Min. bei 37°C im Thermocycler verdaut.

<b>Proteinase-K-Verdau-Mix</b>	10 %iges SDS	155 µl
	H <sub>2</sub> O	235 µl
	Proteinase K (10 mg/ml)	30 µl
	tRNA (2 mg/ml)	30 µl

**Tab. 4.19: Proteinase-K-Verdau-Mix**

Zur Aufreinigung der RNA-RNA-Hybride musste eine Phenol/Chloroform-Extraktion erfolgen. Die Proben wurden mit 150 µl Phenol/Chloroform 30 Sek. geschüttelt und für 5 Min. bei RT und 18000 g zentrifugiert.

Die wässrige Phase wurde abgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 750 µl Präzipitationsmix pipettiert. Das Gefäß wurde kräftig geschüttelt und 30 Min. auf Trockeneis inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 30 Min. bei 14000 rpm und 4°C wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet mit 150 µl 80 %igem Ethanol gewaschen. Im Anschluss erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C für 15 Minuten. Der Überstand wurde abgesaugt, das RNA-Pellet luftgetrocknet und in 6 µl Gel-Loading-Buffer 2 (Ambion, Austin) gelöst.

Als Standard wurde 1 µl einer mit Hybridisierungspuffer (s.o.) hergestellten 1:10 Verdünnung der *working dilution* (s. o.) verwendet, die mit 6 µl Gel-Loading-Buffer 2 versetzt wurde. Danach wurden alle Proben 3 Min. bei 95°C in den Heizblock gestellt.

#### 4.3.2.3 Gelvorbereitung und Auftragen auf das Gel

Die Reagenzien (Tab. 4.8) wurden mit einer Spritze gemischt und dann in die Gelkammer gegossen. Der Gelkamm wurde eingesteckt und das restliche Gel mit der

Spritze über den Taschen verteilt. Das polymerisierte Gel wurde in der Kammer befestigt, die Kammer mit 1x TBE befüllt und 30 Min. bei 60 Watt vorgewärmt.

Reagenz	Volumen
Rotiphorese Sequenziergel Verdünner	56 ml
Rotiphorese Sequenziergel Konzentrat	16 ml
Rotiphorese Sequenziergel Puffer	8 ml
10 %iges APS	640 µl
TEMED	32 µl

**Tab. 4.20: RPA-Gel-Zusammensetzung**

<b><u>10 %iges APS:</u></b>	Ammoniumpersulfat	1 gr
	H <sub>2</sub> O	10 ml

**Tab. 4.21: APS**

Vor der Beladung der Geltaschen wurden diese mit einer Hamilton-Spritze zur Entfernung von Gelresten gespült und die ersten und letzten vier Taschen mit Gel-Loading-Buffer 2 befüllt. In die restlichen Taschen wurden zuerst die Proben, dann die Leerprobe und der Standard gegeben.

Das Gel lief 90 Min. bei 60 Watt, wurde dann auf ein Whatman-Papier überführt, mit einer Folie bedeckt und unter Vakuum bei 80°C für 30 Min. getrocknet.

Danach wurde das Gel in eine Filmkassette mit der Folienseite nach unten auf einen Röntgenfilm gelegt und für 24 Stunden bei -80°C zur Schwärzung des Filmes durch die Radioaktivität belassen. Anschließend wurde der Film entwickelt.

#### **4.4 Western-Blot für die humanen MT-MMP Proteine**

Nach dem RNA-Nachweis der MT-MMP-RNA sollten im Western-Blot die Proteine der humanen MT-MMP (hMT-MMP) detektiert werden. Für die Probengewinnung wurden die MT-MMP und MIGR-II transduzierten Astrozyten aller drei Zellreihen verwendet.

##### **4.4.1 Probengewinnung aus den transduzierten Astrozyten**

Zur Lyse der transduzierten Astrozytenkulturen wurden die Zellen zuerst dreimal mit eiskaltem DPBS auf Eis gewaschen und das DPBS vollständig abgesaugt. Nun wurde 1 ml kalter RIPA-Puffer pro 10 cm Zellkulturschale auf die Astrozyten pipettiert und die

Zellen anschließend mechanisch mit einem Zell-Schaber von der Kulturschale abgelöst. Diese gelösten Astrozyten wurden durch eine Spritze mit einer Kanüle der Größe 22G in ein Eppendorf-Gefäß aufgenommen und mehrmals auf- und abgezogen, um die Astrozyten aufzubrechen. Dieser Vorgang wurde anschließend mit einer kleineren Kanüle (30G) wiederholt. Das Lysat wurde daraufhin 30 Min. auf Eis inkubiert. Die Proben wurden bei -80°C bis zur weiteren Analyse gelagert.

<b>RIPA-Puffer</b>	Natriumchlorid	150 mM
	Natrium-Deoxycholat	0,5 %
	NP-40	1 %
	Phenanthrolin	500 mM
	SDS	0,1 %
	Tris Base pH 8	50 mM
	Vor Verwendung Zugabe von 1 mM EDTA und 4 % Proteinase-Inhibitor-Cocktail	

**Tab. 4.22: RIPA-Puffer**

#### 4.4.2 Western-Blot

Zum Nachweis der Proteine wurden diese zunächst entsprechend ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt. Die Erstellung des SDS-Polyacrylamidgels erfolgte wie in Tabelle 4.9 und 4.10 zusammengefasst. Zuerst wurde das Trenngel gegossen, welches mit Isopropanol abgedeckt wurde, damit sich im Gel eine waagerechte Trennfläche bildete. Nachdem das Trenngel polymersiert war, wurde das Isopropanol abgeschüttet, das Sammelgel auf das Trenngel pipettiert und ein Gelkamm eingesteckt.

Nach dem Festwerden des Sammelgels wurde die Gelkammer nach Herstellerangaben zusammengebaut und mit Laufpuffer (1x) gefüllt.

<b>Laufpuffer 10x</b>	Glycin	144 gr
	10 %iges SDS	100 ml
	Tris Base	30 gr
	H <sub>2</sub> O	Bis auf 1 Liter
<b>Sammelgelpuffer 4x (pH 6,8):</b>	20 %iges SDS	12,5 ml
	Tris Base	6,05 gr
	H <sub>2</sub> O	Bis auf 50 ml
<b>Trenngelpuffer 4x</b>	10 %iges SDS	8 ml
	Tris Base	36,34 gr

(ph 8,0):	H <sub>2</sub> O	Bis auf 200 ml
-----------	------------------	----------------

**Tab. 4.23: Puffer für den Western-Blot**

Trenngel (10 %):

Reagenzien	Volumen
H <sub>2</sub> O	2,9 ml
Trenngelpuffer	1,8 ml
Rotiphorese Gel 30	2,3 ml
10 % APS	35 µl
TEMED	4 µl

**Tab. 4.24: Trenngelzusammensetzung (Western-Blot)**

Sammelgel:

Reagenzien	Volumen
10 % APS	17 µl
H <sub>2</sub> O	2 ml
Rotiphorese Gel 30	430 µl
Sammelgelpuffer	0,8 ml
TEMED	4 µl

**Tab. 4.25: Sammelgelzusammensetzung (Western-Blot)**

Pro Spur auf dem Gel wurden 50 µg Protein eingesetzt. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit 2x Probenpuffer versetzt und für 10 Min. bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung der Proteine im Gel erfolgte bei 200 Volt für 1 ½ Stunden.

Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine Membran erfolgte nach der Semi-Dry Methode. Während des Gel-Laufes wurden sechs Filterpapiere in Gelgröße und eine Immobilon Transfer Membran vorbereitet. Die Filterpapiere wurden in Transfer-Puffer getränkt, die Transfer-Membran wurde mit Methanol benetzt und dann ebenfalls in Transfer-Puffer befeuchtet. Dann wurden drei Filterpapiere auf die Anode des Transferapparates gelegt, darauf die Transfer-Membran, anschließend das Gel und zum Schluss wieder drei Filterpapiere. Zum Blotten wurde die Kathode aufgebracht und eine Spannung von 1 mA/cm<sup>2</sup> angelegt.



<b>Transfer-Puffer 10x (pH 8,3)</b>	Glycin	144 gr
	Tris Base	30,25 gr
	H <sub>2</sub> O	ad 1 Liter
<b>Probenpuffer</b>	10 %iges SDS	2 ml
	Bromophenol blue	0,25 mg
	Glycerin	2 ml
	Mercaptoethanol	0,5 ml
	Sammelgelpuffer (4x)	2,5 ml
	H <sub>2</sub> O	ad 10 ml

**Tab. 4.26: Transfer- und Probenpuffer**

Nach zwei Stunden wurde die Membran aus dem Transferapparat entnommen und für 15 Min. mit Ponceau S gefärbt, um die Trennung sowie auch die Auftragung der Proteine zu beurteilen.

<b>Ponceau S</b>	Ponceau S	2 gr
	Trichloroaceticssäure	30 gr
	Sulfosalicylicsäure	30 gr
	H <sub>2</sub> O	Bis auf 100 ml

**Tab. 4.27: Ponceau S**

Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen der Membran für eine Stunde in 5 %iger Magermilch in TBST blockiert. Die Inkubation mit den Primärantikörpern in seiner jeweiligen Verdünnung erfolgte bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 10 Min. bei RT in TBST gewaschen und anschließend für 1 Std. bei RT mit dem entsprechenden Sekundärantikörper inkubiert. Der Sekundärantikörper war jeweils gegen die Donor-Spezies gerichtet (siehe Tabelle 4.11).

Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde wieder dreimal für 10 Min. bei RT in TBST gewaschen. Um die Proteinbanden zu detektieren, wurde die Membran mit Chemilumineszenzlösung überschichtet. Durch Bindung des Substrats Luminol an die an den Sekundärantikörper gebundene Meerrettichperoxidase wurde dieses in seine oxidierte Form umgesetzt, wobei Licht emittiert wird. Die daraus entstehende Lumineszenz konnte mit dem Detektionssystem Intas Chemostar dargestellt werden (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen).

Chemilumineszenz-Lösung:		
Lösung A (1 ml)	Luminol (5 mM, 0,433 g in 10 ml DMSO)	200 µl
	P-coumaric acid (0,8 mM, 0,148 g in 10 ml DMSO)	88,8 µl
	H <sub>2</sub> O	Bis auf 10 ml
Lösung B (1 ml)	Tris Base (200 mM pH 8,5)	2 ml
	35 %iges Wasserstoffperoxid	5 µl (0,02 %)
	H <sub>2</sub> O	Bis auf 10 ml

Tab. 4.28: Chemilumineszenzlösung

Um eine gleiche Proteinladung in jeder Spur des Gels zu überprüfen, wurde in einer zweiten Inkubtion die Expression des *housekeeping proteins* Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) durchgeführt. Der Nachweis von GAPDH erfolgte analog zum Nachweis der MT-MMPs, jeweils nach deren Darstellung.

Primärer Antikörper	Klonalität/Wirt	Konzentration	Firma
Anti-hMT1-MMP	Monoklonal, Kaninchen	1:2000	Epitomics, Burlingame
Anti-hMT2-MMP	Monoklonal, Maus	1:2000	R&D Systems, Minneapolis
Anti-hMT3-MMP	Polyklonal, Kaninchen	1:1000	Genetex, Irvine
Anti-hMT4-MMP	Monoklonal, Kaninchen	1:1000	Epitomics, Burlingame
Anti-hMT5-MMP	Polyklonal, Kaninchen	1:2000	R&D Systems, Minneapolis
Anti-hMT6-MMP	Monoklonal, Maus	1:2000	R&D Systems, Minneapolis
Anti-GAPDH	Monoklonal, Maus	1:5000	Chemicon (Millipore), Billerica

Tab. 4.29: Primäre Antikörper (Western-Blot)

Alle Primärantikörper wurden in 5% Magermilchlösung verdünnt.

<b>Magermilchlösung (5 %):</b>	Magermilchpulver	10 gr
	TTBS 1x	200 ml
<b>TTBS 10x (pH 7,6)</b>	Natriumchlorid	80 gr (274 mM)
	Tris Base	24,2 gr (40 mM)
	TWEEN 20 detergent	10 ml
	H2O	Bis auf 1 Liter

Tab. 4.30: Magermilchlösung und TTBS 10x

**Sekundäre Antikörper:**

Die sekundären Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:5000 in 5 % Magermilchlösung, verwendet.

*goat-anti-mouse IgG Pox*

Jackson ImmunoResearch, Suffolk

*goat-anti-rabbit IgG Pox*

Jackson ImmunoResearch, Suffolk

**4.5 Immunzytochemie für die humanen MT-MMP Proteine**

Für die Immunzytochemie der hMT-MMP wurden nur Astrozyten der Zellreihe A1 präpariert. Die immunzytochemisch angefärbten Astrozyten wurden unter dem Leica CTR-6000 oder Leica DMI 6000 B im Fluoreszenzmodus beurteilt.

Für die Immunzytochemie wurden die Astrozyten auf sterilen Deckgläschen (Ø 10 mm) kultiviert. Zur Fixierung der Zellen wurden diese zuerst in DPBS gewaschen, um das Kulturmedium zu entfernen, und dann 45 Sekunden in -20°C kaltes Methanol/Aceton (1:1) getaucht, wodurch die Astrozyten fixiert wurden. Danach wurde das Deckgläschen mit Corbit-Balsam auf einen Superfrost-Objektträger mit den Astrozyten nach oben geklebt und luftgetrocknet. Die Deckgläschen wurden mit einem Fettstift umrandet und anschließend 200 µl Blockierungslösung (500 µl BSA (0,5g), 750 µl 20% Triton, 1 ml 5% NaN<sub>3</sub>, ad 50ml PBS) darauf pipettiert. Durch die Blockierungslösung wurde die unspezifische Bindung des Primärantikörpers an andere Proteine verhindert, indem die Bindungsstellen durch Albumin besetzt wurden. Nach 30 Min. wurden 200 µl des Primärantikörpers auf die Deckgläschen gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde der Primärantikörper abgeschüttet und die Deckgläschen mit PBS dreimal 2 Min. lang abgewaschen. Nun wurden 200 µl des Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpers für eine Stunde bei 4°C unter Lichtschutz aufgetragen, um die MT-MMPs durch Fluoreszenz darstellen zu können. Nach Entfernung des

Sekundärantikörpers und 5x 2 Min. Waschen mit PBS wurde 50 µl Fluoromount auf die Zellen gegeben und die Zellen auf dem Deckgläschen mit einem zweiten Deckgläschen eingedeckelt.

#### **Primäre Antikörper:**

Primärer Antikörper	Klonalität/Wirt	Konzentration	Firma
Anti-hMT1-MMP	Monoklonal, Kaninchen	1:20	Epitomics, Burlingame
Anti-hMT2-MMP	Monoklonal, Maus	1:20	R&D Systems, Minneapolis
Anti-hMT3-MMP	Polyklonal, Kaninchen	1:40	Abcam, Cambridge
Anti-hMT4-MMP	Polyklonal, Kaninchen	1:40	Calbiochem, La Jolla
Anti-hMT5-MMP	Polyklonal, Kaninchen	1:10	R&D Systems, Minneapolis
Anti-hMT6-MMP	Monoklonal, Maus	1:20	R&D Systems, Minneapolis

**Tab. 4.31: Primäre Antikörper für die Immunzytochemie**

Die primären Antikörper wurden in Blockierungslösung verdünnt.

<b>Blockierungslösung</b>	5 %iges Natriumazid	1 ml
	20 %iges Triton-X 100	750 µl
	BSA	0,5 gr
	DPBS	Bis 50 ml

**Tab. 4.32: Blockierungslösung**

#### **Sekundäre Antikörper:**

Die sekundären Antikörper wurden 1:1000 in Blockierungslösung verdünnt.

*goat-anti-mouse Alexa Fluor 546*

Invitrogen, Karlsruhe

*goat-anti-rabbit Alexa Fluor 546*

Invitrogen, Karlsruhe

## **4.6 Gelatin-Zymographie**

Mit der Gelatin-Zymographie wurde die Aktivität des MMP-2 direkt über den Verdau von Gelatine dargestellt. Da MT1-, MT2-, MT3- und MT5-MMP proMMP-2 aktivieren können, sollte in der Gelatin-Zymographie indirekt ein Nachweis der Aktivität der hMT-MMP über die Aktivierung von murinem proMMP-2 erfolgen. Die Aktivierung von

proMMP-2 durch MT4- und MT6-MMP ist dagegen umstritten [32, 140, 160, 164]. Proben mit konditionierten Überständen wurden auf ein Polyacrylamid-Gel, welches das Substrat Gelatine enthielt, aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Überall wo sich aktive Gelatinasen befanden, wurde die Gelatine im Gel verdaut. Über eine Anfärbung des Gels mit Coomassie Brilliant Blue konnte der Gelatine-Verdau sichtbar gemacht werden. Da Proteine von Coomassie Brilliant Blue angefärbt werden, stellen die farblosen Banden das Korrelat für die MMP-Aktivität dar.

#### 4.6.1 Gewinnung der konditionierten Überstände

Für die Gelatin-Zymographie wurden konditionierte Kulturüberstände verwendet. Zur Überstandsgewinnung wurde *fetale bovine serum*(FBS)-freies Kulturmedium verwendet, da FBS eventuell Proteine enthält, welche Gelatine abbauen können. Bei der Gewinnung der Überstände wurde wie folgt vorgegangen:

Kulturüberstand
1. Auszählung von 300.000 Astrozyten
2. Kultivierung über zwei Tage mit Kulturmedium in einer 6-well-Kulturschale
3. Absaugen des Kulturmediums
4. Zweimaliges Waschen mit DPBS
5. Pipettieren von 1 ml FBS-freiem Kulturmedium auf die Astrozyten
6. Inkubation für 48 Std
7. Entnahme des konditionierten Kulturüberstandes

**Tab. 4.33: Kulturüberstand (Gelatin-Zymographie)**

Zusätzlich zu dem in Tabelle 4.13 beschriebenen Vorgehen wurden Kulturüberstände von humanen U87-Glioblastomzellen gewonnen, um diese Kulturüberstände mit den transduzierten Astrozyten zu inkubieren. Hierfür wurden 3,5 Millionen humane U87-Glioblastomzellen, die von Prof. J. Bartsch (Klinik für Neurochirurgie) zur Verfügung gestellt wurden, ausgezählt und zwei Tage mit Kulturmedium kultiviert. Dann wurden diese zweimalig mit PBS gewaschen und anschließend 7 ml FBS-freies DMEM hinzugegeben. Nach zwei Tagen wurden 7 ml abgenommen und jeweils 900 µl auf die

transduzierten Astrozyten pipettiert. Von diesen Astrozyten waren vorher 400.000 ausgezählt und zwei Tage mit Kulturmedium kultiviert worden. Nach zwei Tagen wurde der FBS-freie Kulturmediumüberstand von den Astrozyten abgenommen.

#### 4.6.2 Zymographie

Das Gel zur Auftrennung der Proteine wurde wie beim Western-Blot hergestellt mit der Ausnahme, dass zu den Trenngelreagenzien 0,1 % Gelatine (1 mg/ml) hinzugegeben wurde.

20 µl der Proben wurden mit 8 µl Probenpuffer ohne Mercaptoethanol versehen. Danach wurden die 28 µl in die Taschen gegeben und die Proteine im Gel bei 200 V 2 Std. auf Eis aufgetrennt. Das Gel wurde entfernt, wenn die Bromphenol-Blau-Bande den unteren Rand des Gels erreicht hatte. Die Durchführung ist in der folgenden Tabelle beschrieben:

Durchführung
1. 20 Min. Waschen in Renaturierungslösung 1
2. 20 Min. Waschen in Renaturierungslösung 1
3. 20 Min. Waschen in Renaturierungslösung 2
4. 20 Min. Waschen in Renaturierungslösung 2
5. 24 Stunden Inkubation bei 37°C in Pufferlösung
6. Eine Stunde Färbung mit <i>comassie blue</i>
7. Entfärbung mit Entfärbungslösung
8. Trocknung über zwei Tage

**Tab. 4.34: Gelatin-Zymographie**

<i>Lösung</i>	<b>Reagenzien</b>	<b>Volumen/Menge</b>	<b>Endkonzentration</b>
<b><i>Coomassie brilliant blue</i></b>	Brilliant Blue R	2,5 gr	
	Essigsäure	90 ml	
	H <sub>2</sub> O	455 ml	
	Methanol	455 ml	
<b>Entfärbungslösung</b>	Essigsäure	90 ml	
	H <sub>2</sub> O	455 ml	
	Methanol	455 ml	
<b>Renaturierungslösung 1</b>	Calciumchlorid	50 ml (0,1 M)	10 mM
	Tris Base	25 ml (1 M)	50 mM
	Triton X-100	12,5 ml	2,5 %
	H <sub>2</sub> O	413 ml	
<b>Renaturierungslösung 2</b>	Calciumchlorid	50 ml (0,1 M)	10 mM
	Tris Base	25 ml (1 M)	50 mM
	Triton X-100	5 ml	1 %
	H <sub>2</sub> O	420 ml	
<b>Pufferlösung</b>	Calciumchlorid	50 ml (0,1M)	10 mM
	Natriumchlorid	15 ml (5 M)	0,15 M
	Tris Base	25 ml (1 M)	50 mM
	H <sub>2</sub> O	405 ml	
	Natriumazid	5 ml (2 %)	0,02 %

**Tab. 4.35: Gelatin-Zymographie Lösungen**

#### **4.7 Peptid-Substratassay mit fluorogenen Substraten**

Da sich mit Hilfe der Gelatin-Zymographie aufgrund der schon konstitutiv hohen Expression von aktivem MMP-2 die Aktivität der hMT-MMP nicht darstellen ließ, wollten wir mit dem Peptid-Substratassay mit fluorogenen Substraten die enzymatische Aktivität der MT-MMPs nachweisen. Da in der Literatur für MT1- und MT4-MMP Ergebnisse für den Verdau der verfügbaren Substrate vorlagen [31-32, 100], wurden MT1- und MT4-MMP transduzierte Astrozyten untersucht.

Von dem Substrat, welches ein gequenchtes, fluorogenes Molekül enthielt, wurde dieses durch Enzyme wie die MT-MMPs abgespalten. Dadurch wurde das Fluoreszenzmolekül anregbar und emittierte bei geeigneter Anregung eine Fluoreszenz, die gemessen werden konnte. Die Substrate wurden von Prof. J. Bartsch (Klinik für Neurochirurgie,

Universitätsklinikum Marburg) zur Verfügung gestellt.

#### **4.7.1 Zellpräparation**

Zur Zellpräparation wurden MIGR-II transduzierte und MT1- und MT4-MMP transduzierte Astrozyten jeder Zellreihe kultiviert.

Eine 10 cm Kulturschale mit konfluentem Zellrasen wurde dreimal mit DPBS gewaschen, anschließend wurden 400 µl Sucrosepuffer zugegeben (0,25 M Sucrose, 50 mM Tris, pH 8, eine Tablette Proteaseinhibitor von Roche in 50 ml H<sub>2</sub>O).

Daraufhin wurden die Astrozyten mit einem Zellschaber von der Kulturschale gelöst und in dem Sucrosepuffer in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Astrozyten wurden durch Auf- und Abpipettieren in einer Spritze mit einer Kanüle (22 und 30G) aufgebrochen und die Membranen dann bei 13000 g und 4°C pelletiert.

Der Überstand wurde verworfen und das Pellet nochmals in Sucrosepuffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet dann in 200 µl Sucrosepuffer gelöst (nach Moss et al. [101]).

#### **4.7.2 Durchführung**

Für den Peptid-Substratassay wurden 10 µg der Probe verwendet und diese mit Aktivitätsassaypuffer (50 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 µM ZnSO<sub>4</sub>, 0,01 % Brij-35, [100]) auf 60 µl in einer 96-well-Platte aufgefüllt. Zu der Probe wurden 10 µl Substrat (PEPDab005 (TNF-α)= Dabcyl-Leu-Ala-Gln-Ala-Homophenylalanine-Arg-Ser-Lys(5-FAM)-NH<sub>2</sub>, PEPDab008 (proCha)= Dabcyl-Pro-Cha-Gly-Cys(Me)His-Ala-Lys(5-FAM)-NH<sub>2</sub> und MMP-Substrat= Mca-PLGL-Dpa-AR-NH<sub>2</sub>) gegeben und die Fluoreszenz anschließend im Multimode-Mikroplatten-Lesegerät über 2 Std. gemessen (für PEPDab005 und 008 Exzitation bei 485 nm und Emission bei 530 nm, für MT1-MMP-Substrat Exzitation bei 330 nm und Emission bei 485 nm). Als Nullwert (BLANK) wurden 10 µl Substrat und 60 µl Aktivitätsassaypuffer ohne Probe genutzt.

Jede Probe wurde in Triplikaten aufgetragen, um Ungenauigkeiten des Pipettierens auszugleichen. Die drei Werte wurden dann gemittelt.

Das Substrat PEPDab005 wurde nur mit den MT4-MMP-Proben sowie der MIGR-II-Probe getestet. Die Fluoreszenz der Proben wurde über 2 Std. gemessen. Um die Fluoreszenzzunahme zu ermitteln, wurde von den nach 2 Std. gemessenen Werten die



Fluoreszenz des Standards (Peptid-Substratassaypuffer und Substrat) und des Anfangswertes (Erster Wert der Messung: Zellysat, Substratassaypuffer und Substrat) abgezogen.

## 4.8 Migrations- und Invasionsassays

### 4.8.1 *Scratch*-Assay

Der *Scratch*-Assay wurde zum direkten Nachweis der Migrationsfähigkeit von Zellen angewandt. Als Parameter für die Migrationsfähigkeit wurde die Wanderung der Zellen durch einen Kratzer im Zellrasen, den sogenannten *Scratch*, beurteilt.

Für den *Scratch*-Assay wurden 300.000 Astrozyten ausgezählt und zwei Tage in einer 6-well-Platte mit Kulturmedium kultiviert. 12 Std. vor der Durchführung des *Scratch* wurden die Astrozyten zweimal mit DPBS gewaschen und in FBS-freiem Medium inkubiert. Dann wurde mit einer gelben Pipettenspitze senkrecht von oben nach unten durch jedes Well gekratzt, sodass ein Defekt im Astrozytenrasen entstand. Zur Entfernung der Zelltrümmer wurden die Zellen mit serumfreien Medium gewaschen und die Breite des Kratzers wurde mit Hilfe der Kamera des Mikroskops mit einer 10-fachen Vergrößerung in fünf Bildern dokumentiert. 24 Std. später wurden erneut jeweils fünf Bilder von dem Kratzer gemacht. Diese Bilder wurden ausgedruckt und die Seiten des Kratzers mit einem Kugelschreiber markiert. Die Astrozyten innerhalb der Markierungen wurden ausgezählt und die Ergebnisse statistisch ausgewertet. Für jede Zellreihe wurden zwei Versuche angesetzt, sodass pro Zellreihe 10 Fotos und insgesamt für die MIGR-II und hMT-MMP transduzierten Astrozyten 30 Bilder ausgezählt wurden.

Für die statistische Auswertung wurde eine dreifaktorielle Varianzanalyse, ANOVA (*Analysis of variance*), durch Frau Dr. Timmesfeld vom Institut der medizinischen Biometrie und Epidemiologie durchgeführt. Mit dieser Analyse wurde getestet, ob die Varianz zwischen den Gruppen (MIGR-II, MT-MMPs) größer ist als die Varianz innerhalb der einzelnen Gruppe. Voraussetzungen für diese Analyse waren die Normalverteilung und die Varianzhomogenität der gemessenen Werte. Diese Voraussetzungen waren bei den gemessenen Werten des *Scratch*-Assay gegeben. Die Faktoren dieser Varianzanalyse waren MT-MMP-Spezies, Zellreihe und Versuchsansatz. In Verknüpfung zum ANOVA-Test wurde ein Tukey Range Test angeschlossen. Dieser vergleicht die Mittelwerte zweier Gruppen (z.B. Kontrolle gegen MT1-MMP, MT1-MMP gegen MT2-MMP). Es wurde der Unterschied zwischen den Mittelwerten, der

größer als der Standardfehler ist, detektiert. Hieraus konnte das Signifikanzniveau errechnet werden [11].

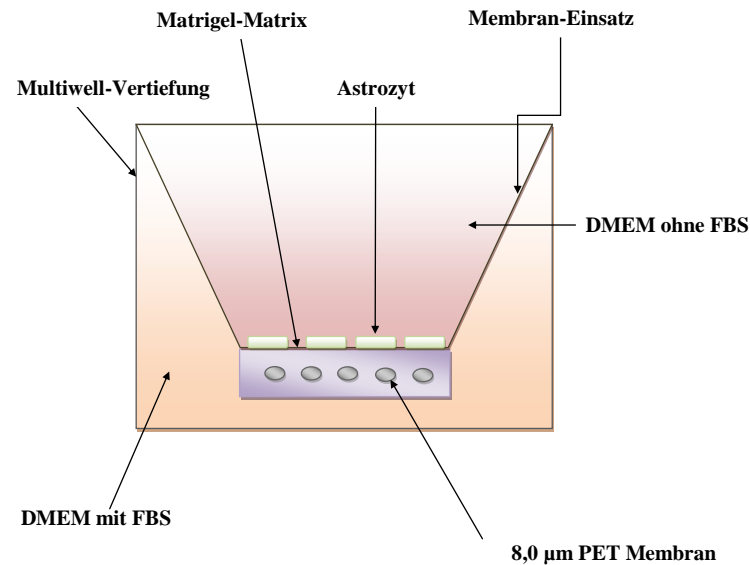
Für die Analyse wurde die statistische Software R (Version 2.15.0, Package multcomp) verwendet. Alle p-Werte unter 0,05 wurden als signifikant bewertet.

#### 4.8.2 Matrigel-Invasions-Assay

Der Matrigel-Invasions-Assay (BD Biosciences, Heidelberg), eine in-vitro Standardmethode, wurde durchgeführt, um die Astrozyten auf ihre Fähigkeit zur Invasion und Migration in eine künstliche Matrix zu untersuchen. Diese Methode wurde angewandt, um die Ergebnisse dieses Assays mit dem neuen Migrationsassay zu vergleichen.

In eine 24-well-Kulturschale wurde in jedes Well ein *Trans-Well* (BD Biosciences, Heidelberg) eingesetzt. Am Boden des Einsatzes befand sich eine Membran, die Poren der Größe 8,0 µm enthielt, durch die die Zellen wandern konnten (s. Abb. 4.4). Oberhalb der Membran befand sich eine Matrigel-Matrix, welche die natürliche Beschaffenheit einer EZM nachempfunden. Zu den Bestandteilen des Matrigels gehörten unter anderem Laminin, Kollagen 4, Heparansulfat, Entactin und Nidogen. Durch diese Matrix konnten nur Zellen wandern, die diese EZM-Bestandteile degradieren konnten. Zudem enthielt das Matrigel Wachstumsfaktoren wie FGF, EGF, *insuline-like growth factor*, *tissue plasminogen activator* und TGF-β.

Vor Versuchsbeginn wurde der Matrigel-Membran-Einsatz für zwei Stunden mit DMEM ohne FBS inkubiert. Danach wurden 50000 Astrozyten für jeden Matrigel-Membran-Einsatz ausgezählt und in serumfreiem DMEM in den Membran-Einsatz auf die Matrigel-Matrix gegeben. In das well der Kulturschale wurde DMEM mit 5 % FBS pipettiert, welches als Chemoattraktans wirkte. Nach 24 Std. wurde mit Q-Tips die Oberfläche der Matrix von den restlichen adhäsiven Zellen befreit und die Membran-Einsätze 2 Min. in Methanol fixiert. Dann wurden die Zellen mit 1 %iger Toluidin-Lösung für 2 Min. gefärbt und anschließend unter dem Mikroskop ausgezählt.



#### Abb. 4.4: Matrigel-Invasions-Assay

Dargestellt ist der Matrigel-Invasions-Assay Membran-Einsatz, der in eine 24-well-Kulturschale (multiwell-Vertiefung) überführt wurde. Oberhalb der Matrigel-Matrix wurden die Astrozyten in DMEM ohne FBS pipettiert und in den well unterhalb des Membraneinsatzes Kulturmedium (DMEM mit FBS 10% FBS).

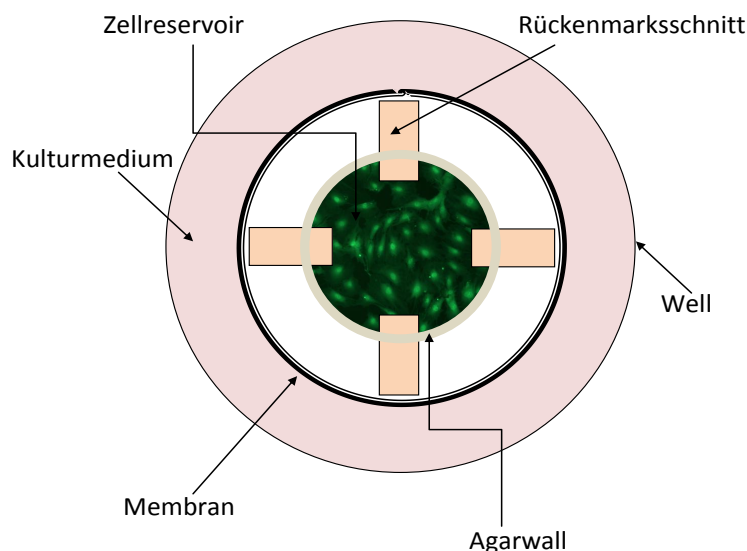
### 4.8.3 OPoSSM-Assay

#### 4.8.3.1 OPoSSM-Assay: Aufbau

Im neu etablierten OPoSSM (*Organotypic porcine spinal splice migration*)-Assay sollte die Invasion und Migration der Tp53-defizienten Astrozyten im organotypischen Substrat (ZNS) untersucht werden, um einen Vergleich zur Migration und Invasion in artifiziellen Matrices wie Matrigel anstellen zu können. So sollte das migratorische Potential in Abhängigkeit von der Matrix beurteilt werden. Als Vorbild für den OPoSSM-Assay dienten kompartimentierte Kulturen nach Campenot et al. und Belien et al. [6, 15].

Für den OPoSSM-Assay wurde Rückenmark von Schweinen verwendet (eine großzügige Spende von Tonis Wurstladen, Bauerbach). Das Rückenmark wurde sofort nach der Schlachtung des Tieres mit Dura mater entnommen und auf Eis gekühlt. Im Labor wurde die Dura mater entfernt, das Rückenmark in kleinere Stücke von 1 cm Länge zerteilt und in Stickstoff schockgefroren, um es zu einem späteren Zeitpunkt zu

verwenden. Für den OPoSSM-Assay wurden die Rückenmarksscheiben wieder aufgetaut, ein Stück von 1 cm Länge und 0,5 cm Breite abgeschnitten und mit 80 % Ethanol gewaschen. Dann wurden die Meningen sowie die graue Substanz von der weißen abpräpariert. Die weiße Substanz wurde als Substrat für den OPoSSM-Assay genutzt, da sie polar aufgebaute Nervenbahnen enthält. Dies ist eine gute Voraussetzung für die Wanderung der Astrozyten in eine Richtung. Danach wurde das Rückenmark in Längsrichtung mit einem Mc Ilwain Tissue Chopper in 300 µm dicke Schnitte zerteilt. Jeweils vier Rückenmarksschnitte wurden in einem Winkel von 90° zueinander senkrecht zum Außenring der Millipore-Membran gelegt, die mit DMEM in einer 6-*well*-Platte vorbereitet war. Mit 1,5 %igem Agar wurde ringförmig ein Wall über die Rückenmarksschnitte appliziert, wobei die Kante der Schnitte frei von Agar gehalten wurde, sodass innerhalb dieser Verbindungen ein rundes Reservoir entstand (Abb 4.5). Zu beachten war, dass der Agarwall über den Schnitt mehrmals nachappliziert werden musste, um ein Überlaufen der Astrozyten, die in 5 µl Kulturmedium resuspendiert waren, zu verhindern. Vor diese Schnitte wurden  $10^5$  Astrozyten appliziert und diese präparierten Rückenmarksschnitte für eine Woche bei 37°C im Brutschrank inkubiert.



**Abb. 4.5: Schematischer Aufbau des OPoSSM-Assay**

Eine Millipore-Membran wurde in eine Vertiefung einer 6-*well*-Kulturschale überführt und darauf vier Rückenmarksschnitte in jede Himmelsrichtung gelegt. Über den Anfang des Schnittes wurde ein Agarwall appliziert, der den Rückenmarksschnitt an dieser Stelle bedeckte. In der Mitte der Membran, dem Zellreservoir, wurden die Astrozyten vor den Rückenmarksschnitt gesetzt.

#### 4.8.3.2 Auswertung der Astrozytenwanderung in den Rückenmarksschnitten

Da die Astrozyten entgegen der Annahme nicht einzeln in die Rückenmarksschnitte einwanderten, sondern komplexe kettenartige Strukturen bildeten, wurde die Auszählung der Astrozytenketten als die bestmögliche Auswertungsform beurteilt. Somit wurde zwar nicht die genaue Zahl der in den Rückenmarksschnitt eingewanderter Astrozyten erfasst, aber man konnte die Migrationsfähigkeit über die beiden Parameter Eindringtiefe und die Kettenanzahl beurteilen.

Nach 1, 2, 3, 4 und 5 mm, gemessen vom Anfang des Rückenmarksschnittes, wurde auf der ganzen Breite der Rückenmarksschnitte die Anzahl der Astrozytenketten gezählt. Da die Rückenmarksschnitte sich im Zuge der Fixierung verlängerten, wurde deren Länge vor und nach Fixierung gemessen und der Faktor in die Millimetermessung mit einberechnet. D.h., wenn ein Rückenmarksschnitt sich um 0,3 mm verlängerte, wurde erst ab 1,3, 2,6, 3,9, 5,2 und 6,5 mm gezählt. Die Zählung der Astrozytenketten der Zellreihen A2 und A3 erfolgte durch vier verblindete Untersucher. Die Zellreihe A1 wurde nicht verwendet, da die Zellen älter als die Zellen der Zellreihen A2 und A3 waren. Insgesamt wurden für die mit Kontrollvektor bzw. hMT-MMP transduzierten Astrozyten pro Zellreihe A2 und A3 zehn Rückenmarksschnitte ausgewertet, was insgesamt 140 Rückenmarksschnitten entspricht. Aufgrund des Aufwandes konnten nicht alle 140 Rückenmarksschnitte gleichzeitig präpariert werden, sodass die Anfertigung in vier Ansätzen erfolgte.

Für die statistische Auswertung wurde eine dreifaktorielle Varianzanalyse, ANOVA (*Analysis of variance*), durch Frau Dr. Timmesfeld vom Institut der medizinischen Biometrie und Epidemiologie durchgeführt. Mit dieser Analyse wurde getestet, ob die Varianz zwischen den Gruppen (MIGR-II, MT-MMPs) größer ist als die Varianz innerhalb der einzelnen Gruppe. Voraussetzungen für diese Analyse waren die Normalverteilung und die Varianzhomogenität der gemessenen Werte. Die Faktoren dieser Varianzanalyse waren Kettenanzahl und Eindringtiefe.

In Verknüpfung zum ANOVA-Test wurde ein Tukey Range Test angeschlossen. Dieser vergleicht die Mittelwerte zweier Gruppen (z.B. Kontrolle gegen MT1-MMP, MT1-MMP gegen MT2-MMP). Es wurde der Unterschied zwischen den Mittelwerten, der größer als der Standardfehler ist, detektiert. Hieraus konnte das Signifikanzniveau

errechnet werden [11].

Für die Analyse wurde die statistische Software R (Version 2.15.0, Package multcomp) verwendet. Alle p-Werte unter 0,05 wurden als signifikant bewertet.

#### 4.8.3.3 Immunzytochemie der Astrozyten in den Rückenmarksschnitten

Für den immunzytochemischen Nachweis von den Astrozyten im Rückenmark wurden die Astrozyten mit einem primären Antikörper gegen GFP markiert. Durch einen Alexa Fluor Sekundärantikörper wurde die Fluoreszenz der Astrozyten dann verstärkt, sodass diese besser im Rückenmarksschnitt zu sehen waren.

Primärer Antikörper	Klonalität/Wirt	Konzentration	Firma
Anti-eGFP	Polyklonal, Kaninchen	1:5000	Abnova, Taipei City
Sekundärer Antikörper	Klonalität/Wirt	Konzentration	Firma
<i>Anti-goat</i> Alexa Fluor 488	Polyklonal, Ziege	1:1000	Invitrogen, Karlsruhe

**Tab. 4.36: Antikörper (Immunzytochemie des OPoSSM-Assays)**

Die Antikörper wurden in Blockierungslösung verdünnt.

<b>Blockierungslösung</b>	5 %iges Natriumazid	1 ml
	20 %iges Triton-X 100	750 µl
	BSA	0,5 gr
	DPBS	Bis 50 ml

**Tab. 4.37: Blockierungslösung**

Der Assay wurde mit Fotos jeweils an Tag 0 und Tag 7 dokumentiert. An Tag 7 wurden die Schnitte mit 4 ml 4 %igem Formalin in der 6-*well*-Platte über Nacht bei 4°C fixiert. Nach der Fixierung wurde der Agar von den Schnitten gelöst und die Rückenmarksschnitte in eine 24-*well*-Platte überführt.

Durchführung
1. 30 Min. Waschen mit <i>tris buffered saline</i> bei RT
2. Zweimaliges Waschen mit DPBS für 15 Min. bei RT
3. Blockierung mit Blockierungslösung über Nacht bei 4°C
4. Abnehmen der Blockierungslösung und Zugabe von 400 µl des eGFP-Antikörpers
5. Drei Tage Inkubation bei 4°C
6. Viermaliges Waschen mit DPBS für 30 Min. bei RT
7. Inkubation für 3 Tage mit 400 µl des Sekundärantikörpers bei 4°C bei Dunkelheit
8. Viermaliges Waschen mit DPBS für 30 Min. bei RT
9. Übertragung der Schnitte auf einen Quadriperm Superfrost Plus-Objektträger und Fixierung mit Fluoromount und einem Deckgläschen über Nacht

**Tab. 4.38: Immunzytochemie (Migrationsassay)**

#### 4.8.3.4 Semidünnschnitte und konfokale Mikroskopie der Rückenmarksschnitte

Zur Herstellung von Semidünnschnitten wurden die Rückenmarksschnitte nach dem OPoSSM-Assay in 2 % Glutaraldehyd fixiert und mit Phosphat-Puffer nach Sörensen gepuffert (Kaliumdihydrogenphosphat). Danach wurden diese in Osmium Tetroxid fixiert und in Harz eingebettet. Die im Harz befindlichen Schnitte wurden 1 µm dick geschnitten und mit Toluidin-Blau angefärbt.

Für die konfokale Mikroskopie wurden Rückenmarksschnitte aus der Immunzytochemie verwendet. Die Bilder wurden in der Abteilung für Zytopathologie (Prof. R. Jacob) mit einem Leica TCS SP2 Mikroskop mit einem 20x Fluotar Objektiv gemacht. Zur 3D Rekonstruktion wurden Bilder von 25 Schichten des Rückenmarksschnittes über 100 µm aufgenommen und anschließend mit dem Velocity Software Package bearbeitet (Improvision, Coventry).

<b>Stammlösung A</b>	Kaliumdihydrogenphosphat	11,876 g
	Aqua dest.	Bis 1 l
<b>Stammlösung B</b>	Dinatriumhydrogenphosphat-	9,078 g
	Aqua dest.	Bis 1 l



<b>Phosphat-Puffer (pH 6,1)</b>	Stammlösung A	85 ml
	Stammlösung B	15 ml

**Tab. 4.39: Lösungen für Semidünnschnitte**

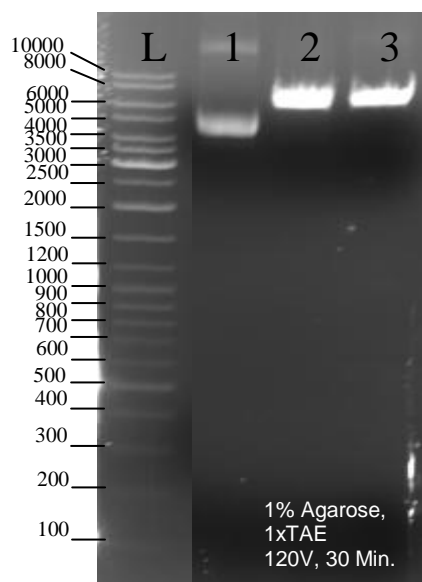
## 5. Ergebnisse

Wie in Abschnitt 4.2.3 beschrieben wurden 3 unabhängige Astrozytenkulturen (A1-A3) angelegt, um die Wahrscheinlichkeit, dass die Ergebnisse durch Zufall entstanden sind, zu minimieren. Die Transduktion mit den *mt-mmp cDNAs* in dem MIGR-I- oder MIGR-II-Vektor sowie dem Leervektor MIGR-II wurde mit jeder der drei Zellreihen durchgeführt. Der RNA- und Proteinnachweis der hMT-MMP erfolgte jeweils mit einer Probe aus jeder Zellreihe.

### 5.1 Allgemeine DNA-Techniken

#### 5.1.1 Klonierung

Für die Klonierung der *mt-mmp cDNAs* wurden der MIGR-I- und MIGR-II-Vektor herangezogen. Auf Abbildung 5.1 ist der Kontrollverdau des MIGR-II-Vektors zu sehen, der (Spur 1) nicht durch BglII geschnitten wird. Er zeigte sich als eine unter 6000 bp liegende Bande bei 4000 Basenpaaren mit einem Schweif mehrerer schwacher Banden darüber. Spur 2 und Spur 3 zeigt den durch die Enzyme EcoRI und BamHI linearisierten MIGR-II-Vektor bei 7000 Basenpaaren, obwohl dieser normalerweise eine Größe von 6000 Basenpaaren hat.



**Abb. 5.1: Kontrollverdau des MIGR-II**

L= Größenleiter in Basenpaaren

1= MIGR-II BglII verdaut

2= MIGR-II EcoRI verdaut

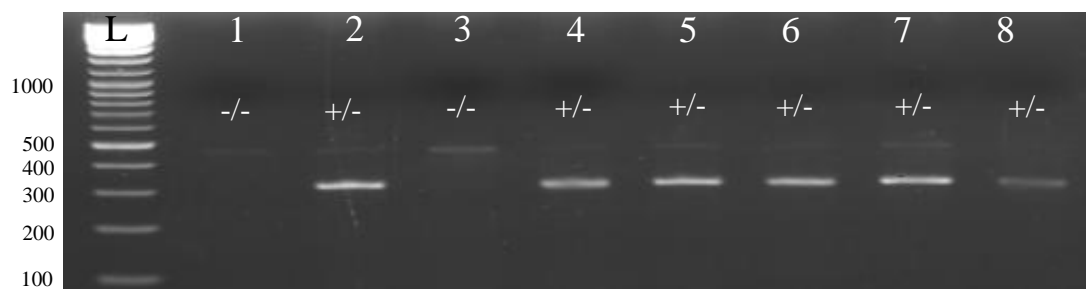
3= MIGR-II BamHI verdaut

In Kapitel 7.5 des Anhangs sind die Gele der Kontrollverdaue der in den MIGR-I- und MIGR-II-Vektor klonierten *mt-mmp cDNAs* dargestellt. Die analysierte DNA auf diesen Gelen stammt aus den jeweiligen Maxi-Präparationen. Die Beladung der 1 %igen Agarose-Gele sowie die eingesetzten Restriktionsenzyme sind den Beschriftungen der Abbildungen zu entnehmen. Alle Banden entsprachen den erwarteten Banden.

### 5.1.2 Genotypisierung der $Tp53^{-/-}$ -Mauslinie

Um die  $Tp53^{-/-}$ -Mäuse zu identifizieren, wurde eine Genotypisierung mittels  $Tp53$ -PCR vorgenommen. Bei dieser konnten insgesamt drei homozygote Mäuse ermittelt werden, deren Astrozyten für die Transduktion genutzt wurden.

Wie auf Abbildung 5.2 zu sehen ist, zeigten die Mäuse 2, 4, 5, 6, 7 und 8 sowohl eine Amplifikation des Wildtyp- und des  $Tp53$ -Allels und waren somit heterozygot. Maus 1 und 3 hatten ausschließlich eine  $Tp53^{-/-}$ -Bande und waren somit homozygot.



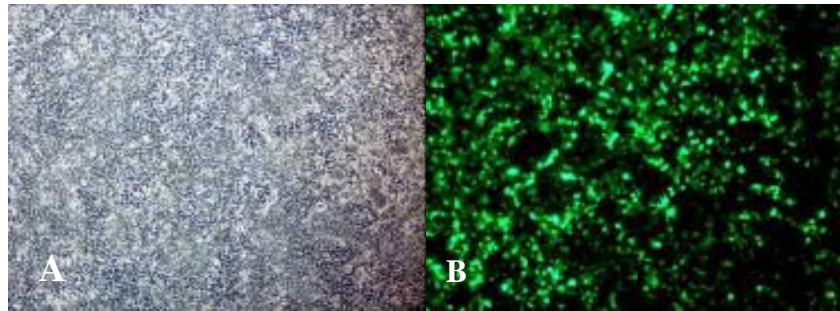
**Abb. 5.2: SB-Agarose-Gel der Versuchstier-Genotypisierung**

Ein 450 bp Fragment ist bei homozygoten *knockout*-Mäusen (-/-), 2 Fragmente (450 bp und 310 bp) sind bei heterozygoten (+/-) Mäusen zu sehen. L= Ladder

## 5.2 Zellkulturnachweise

### 5.2.1 Transfektion

Zur Herstellung von infektiösen Retroviren wurden Phoenixzellen verwendet, die mit den retroviralen Expressionsvektoren transfiziert wurden. Die Transfektionseffizienz lag bei 30-40 %. Mit den infektiösen Retroviren konnten die  $Tp53^{-/-}$ -Astrozyten transduziert werden.



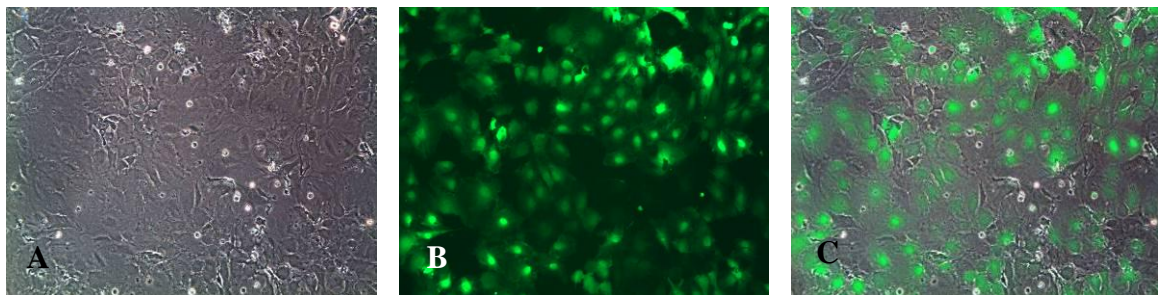
**Abb. 5.3: Transfizierte Phoenixzellen**

A: Phasenkontrastmikroskop, 100x

B: Fluoreszenzmikroskop, 100x

### 5.2.2 Transduktion der $Tp53^{-/-}$ -Astrozyten

Mit den in Transfektion hergestellten Retroviren wurde die Astrozyten anschließend transduziert. Die Transduktionsrate wurde anhand der GFP-Fluoreszenz mit einem Fluoreszenzmikroskop überprüft (Abb. 5.4), wobei eine Transduktionsrate von durchschnittlich ca. 60-80 % festgestellt werden konnte.



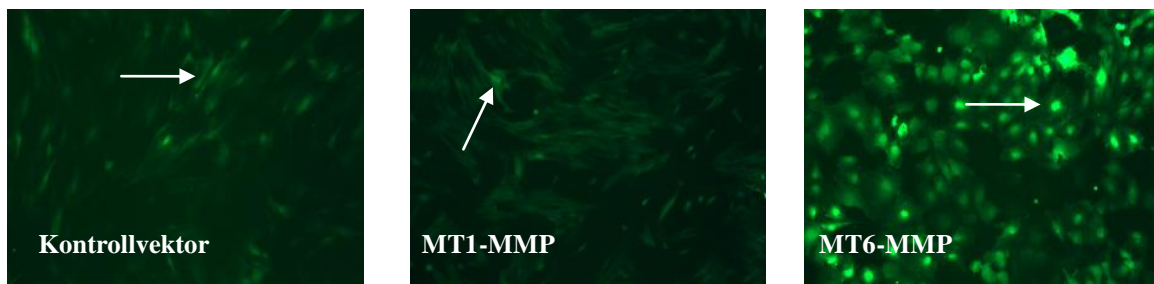
**Abb. 5.4: MT6-MMP transduzierte Astrozyten**

A: Primäre Astrozytenkultur der Zellreihe A1(Phasenkontrastmikroskop, 100x).

B: GFP-Expression transduzierter Astrozyten (Fluoreszenzmikroskop, 100x)

C: Überlagerung (Bild A+B): Die Transfektionsduktionseffizienz beträgt etwa 60-80%.

Auffällig war hierbei, dass die MT6-MMP-Astrozyten in allen drei Zellreihen die kräftigste Fluoreszenz aufwiesen, wohingegen sich die GFP-Fluoreszenz der anderen hMT-MMP transduzierten Astrozyten in allen Zellreihen schwach bis mäßig fluoreszierend zeigte (Abb. 5.5).



**Abb. 5.5: Kontrollvektor- und MT-MMP transduzierte Astrozyten**

Die Bilder wurden alle mit der gleichen Belichtungszeit, sowie den gleichen Kontrast- und Helligkeitseinstellungen aufgenommen (Fluoreszenzmikroskop, 100x)

Kontrollvektor: Schwache Fluoreszenz in den Astrozyten (Pfeil)

MT1-MMP: Schwache Fluoreszenz in den Astrozyten (Pfeil)

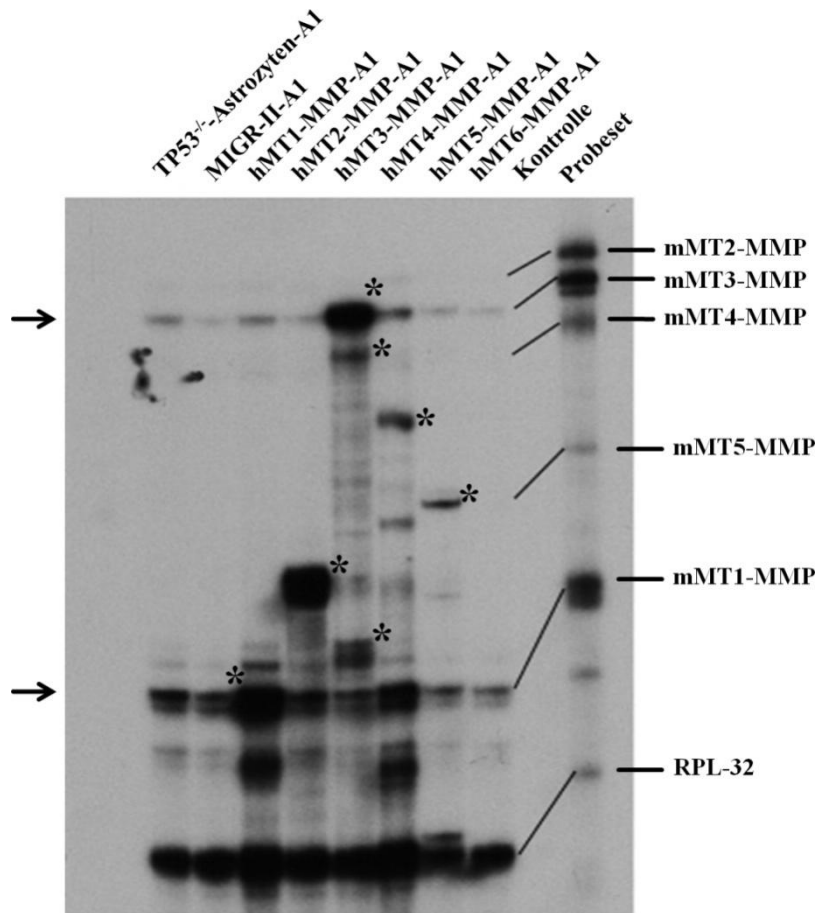
MT6-MMP: Stark GFP-positive Astrozyten (Pfeil)

### 5.3 RNase-Protection-Assay (RPA)

Zum Nachweis der Expression der murinen MT-MMP-(mMT-MMP) und humanen MT-MMP(hMT-MMP) RNA wurde ein RNase-Protection-Assay (RPA) durchgeführt. Als Ladungskontrolle diente eine Sonde gegen das *ribosomale Protein L32*. Das Auftragsschema der Proben von links nach rechts war bei jeder RPA gleich: 1) RNA der nicht transduzierten Tp53<sup>-/-</sup>-Astrozyten, 2) RNA der MIGR-II transduzierten Astrozyten, 3-8) RNA der MT-MMP transduzierten Astrozyten, 9) Leerprobe (enthält 6 µl H<sub>2</sub>O und keine Radioaktivität), 10) Probeset, das dem Sondenmix (s. auch 4.3.2) entspricht. Das Probeset diente als Orientierung, um die Banden in den Proben den einzelnen Sonden im Probeset zuzuordnen.

#### Auswertung RPA I

Zuerst wurde mit einem mMT-MMP-Probeset nachgewiesen, inwiefern die nicht transduzierten Tp53<sup>-/-</sup>-Astrozyten und MIGR-II Kontrollastrozyten der Zellreihe A1 endogen mMT-MMP RNA exprimieren. Das Probeset vom ersten Gel in Abb. 5.6 enthielt Sonden für murines MT1-, MT2-, MT3-, MT4- und MT5-MMP (mMT-MMP) sowie für *ribosomale Protein L32*. Da die Sonde für murines MT6-MMP in dem Probeset nicht enthalten war, musste ein zusätzlicher Ansatz hergestellt werden (Abb. 5.6 B).



**Abb. 5.6 A: Nachweis der murinen MT1-MT5-MMP RNA in den Kontrollastrozyten und den MT-MMP transduzierten Astrozyten**

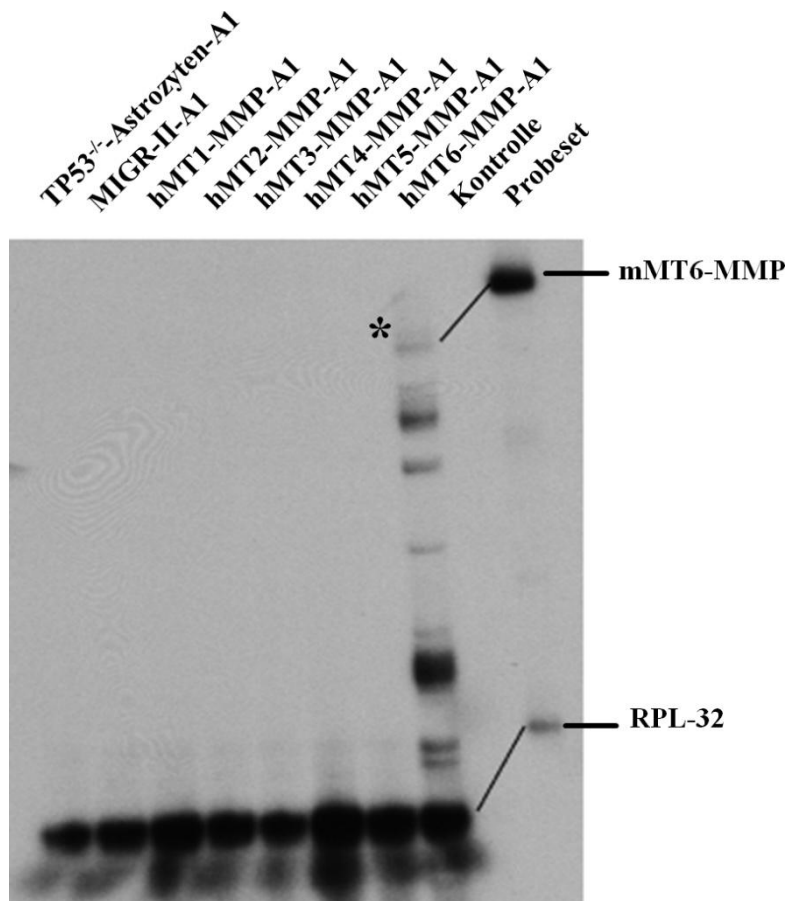
A.: Nachweis der murinen MT1- bis MT5-MMP RNA:

Pfeile: Konstitutive Expression des mMT1- und mMT3-MMP der Astrozyten

Sterne: Zusätzliche Banden, die nicht der konstitutiven Expression der mMT-MMP zugeordnet werden konnten

Spur 9: Kontrolle (Leerprobe). RPL32= *ribosomal protein L32*

Die Bande für mMT1-MMP war besonders stark in der hMT1-MMP-Probe aufgrund der Kreuzhybridisierung von humanen MT1-MMP mit der mMT1-MMP-Sonde. Dies trifft auch auf die starken Banden in der mMT2-, mMT3-, mMT4- und mMT5-MMP-Probe zu. Neben diesen starken Banden waren in allen Astrozyten die erwartete konstitutive Expression von mMT1- und mMT3-RNA zu sehen.



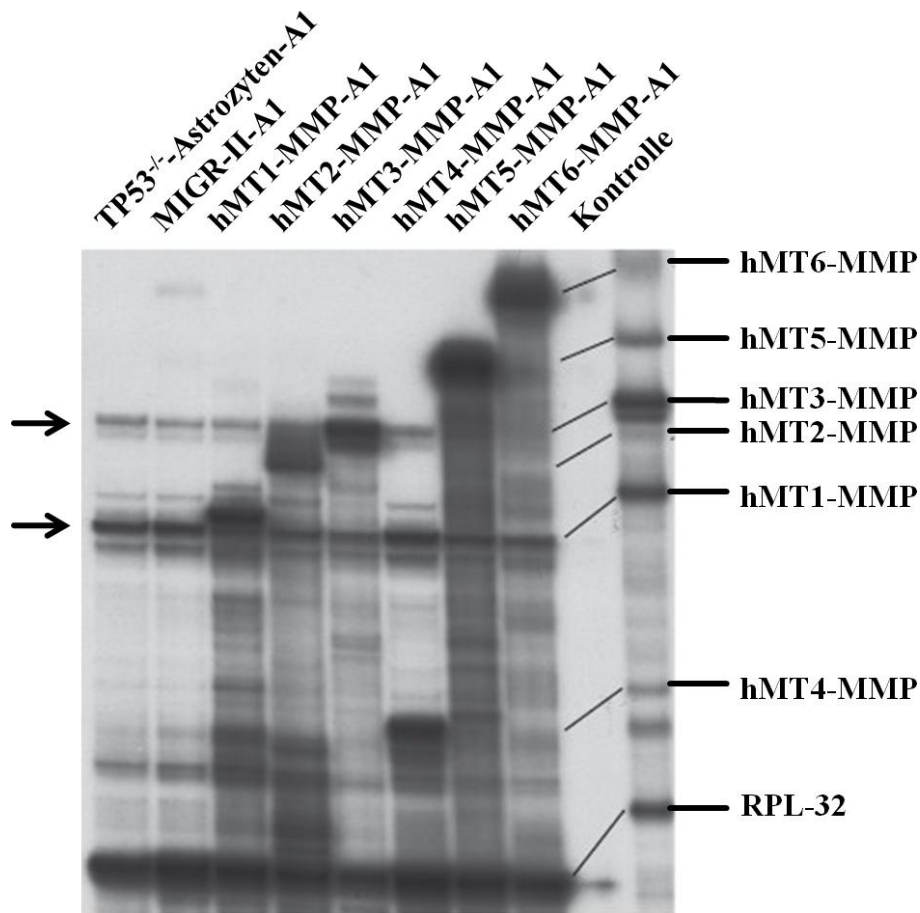
**Abb. 5.6 B: Nachweis der murinen MT6-MMP RNA in den Kontrollastrozyten und den MT-MMP transduzierten Astrozyten.**

Stern: Nachweis der murinen MT6-MMP RNA

Spur 9: Kontrolle (Leerprobe). RPL32= *ribosomal protein L32*

#### Auswertung RPA II:

In der RPA II wurde überprüft, ob die humane *mt-mmp cDNA* in die mRNA der hMT-MMP transkribiert wurde (Abb. 5.7). Das Probeset bestand aus den einzelnen Sonden für die humanen MT-MMPs 1 bis 6 und dem Ribosomalen Protein L32. Die Expression der mRNA der hMT-MMP in den transduzierten Astrozyten konnte über alle Zellreihen hinweg bestätigt werden. Als Beispiel ist hier das RPA-Gel der Zellreihe A1 gezeigt.



**Abb. 5.7: Nachweis der humanen MT-MMP RNA**

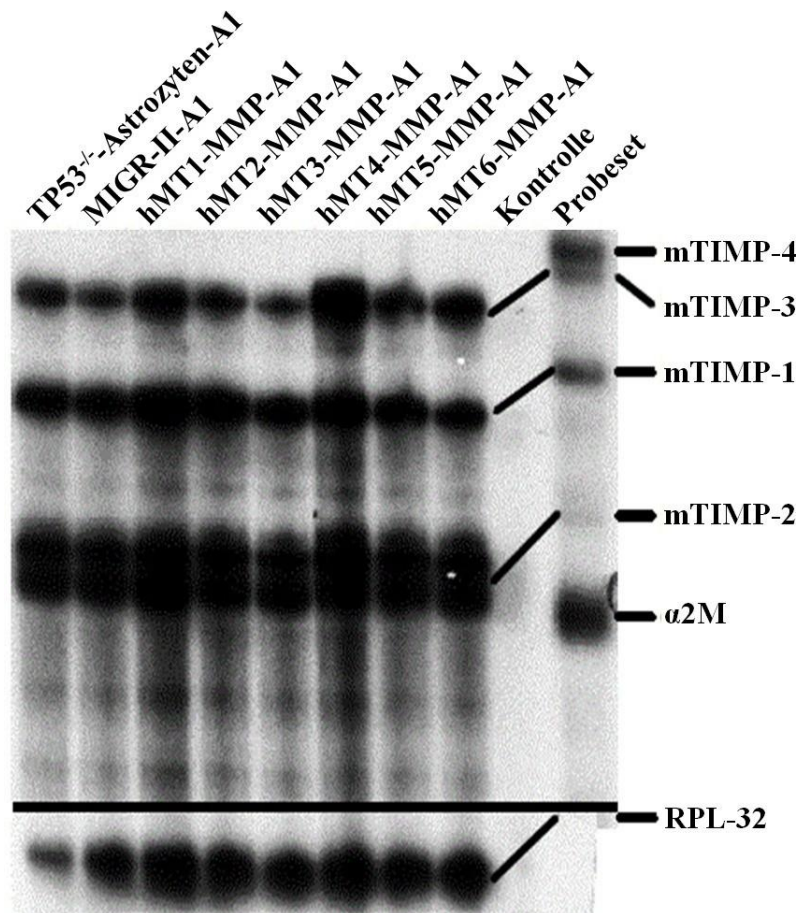
Nachgewiesen wurde die Expression der hMT-MMP in den jeweiligen Proben der Zellreihe A1 (Spur 3-8). Die Pfeile markieren die Expression vom humanen MT3- und MT1-MMP in allen aufgetragenen Proben. Auf Spur 9 wurde die Kontrolle (Leerprobe) aufgetragen. L32= *ribosomal protein L32*

#### Auswertung RPA III:

Aufgrund einer möglichen Veränderung der TIMP-Expression in den murinen Astrozyten durch die Expression der hMT-MMP, wurde eine weitere RPA zum Nachweis von TIMP 1 bis 4 durchgeführt. Beispielsweise hätte eine gleichzeitige Aufregulation der TIMP-Expression den Effekt der hMT-MMP-Überexpression antagonisieren können.

Es war jedoch kein Unterschied in der TIMP-Expression zwischen den *Tp53-knockout*-Astrozyten (Spur 1), den mit dem MIGR-II-Vektor transfizierten Astrozyten (Spur 2) und den mit den humanen MT-MMP transduzierten Astrozyten (Spur 3-8) (alle Zellreihe A1) erkenntlich.





**Abb. 5.8: Nachweis der TIMP RNA**

Zu sehen ist die Expression der TIMP der Kontrollastrozyten (Tp53 und MIGR-II) und der hMT-MMP transduzierten Astrozyten. Es bestand kein Unterschied in der Expression. Auf Spur 9 wurde die Kontrolle (Leerprobe) aufgetragen.  $\alpha 2M$ = Alpha-2-Makroglobulin, RPL32= *ribosomal protein L32*

## 5.4 Western-Blot für die humanen MT-MMP Proteine

Der Nachweis der hMT-MMP in den murinen Tp53<sup>-/-</sup>-Astrozyten auf Proteinebene wurde durch Western Blots mit je einer Probe der Zellreihen A1-A3 der hMT-MMP transduzierten und der MIGR-II transduzierten Astrozyten erbracht. Es konnten alle MT-MMPs mit Ausnahme von MT2- und MT5-MMP in den Proben der hMT-MMP transduzierten Astrozyten nachgewiesen werden. Auf den Western Blots waren eine oder mehrere spezifische Banden zu sehen, die laut Literatur den aktiven oder inaktiven Formen der jeweiligen MT-MMPs entsprachen.

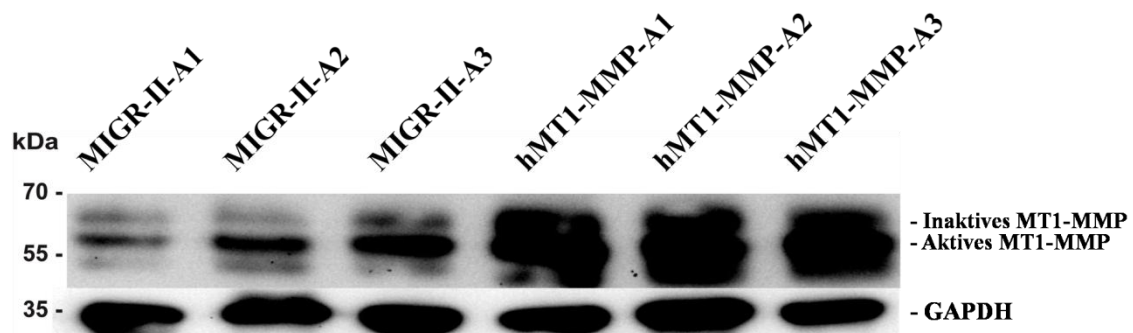
Die Intensität bzw. Intensitätsdichte der Banden wurde für MT1- und MT4-MMP mit dem Programm Image J berechnet, um die Expression des MT1- und MT4-MMP in den hMT-MMP transduzierten Astrozyten gegenüber den MIGR-II transduzierten Astrozyten relativ zu quantifizieren. Für die Berechnung wurde stets die gleiche Fläche

herangezogen.

#### 5.4.1 MT1-MMP

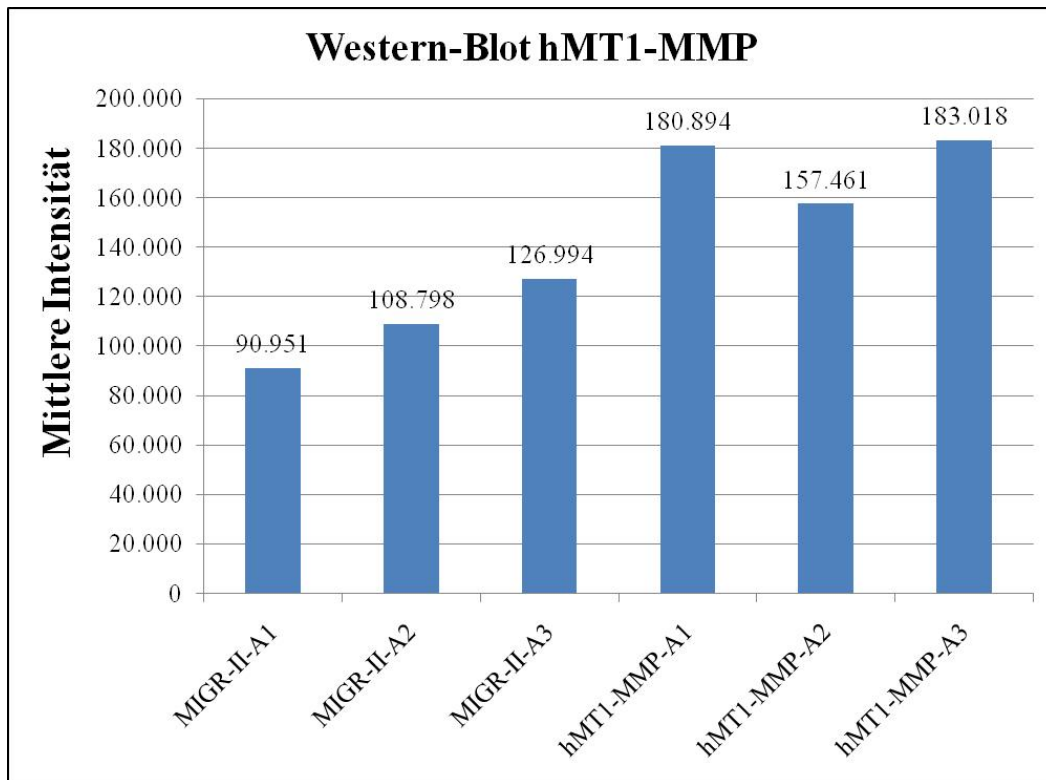
Im Western Blot für MT1-MMP waren drei Banden bei etwa 65, 60 und 53 kDa detektierbar (Abb. 5.9). Die oberste Bande könnte der inaktiven Form des MT1-MMP, die mittlere Bande der aktiven Form entsprechen. Bei der dritten Bande könnte es sich um ein Abbauprodukt handeln. Da der Antikörper gegen MT1-MMP nicht nur humanes, sondern auch murines MT1-MMP bindet, war in den MIGR-II-Proben die konstitutive Expression von murinem MT1-MMP detektierbar.

In den Lysaten der MIGR-II transduzierten Astrozyten zeigte sich eine mäßige konstitutive Expression aller drei Banden, wobei die mittlere Bande - entsprechend der aktiven Form- am stärksten war. In den MT1-MMP transduzierten Astrozytenkulturen zeigte sich eine 1,6fach stärkere Expression des MT1-MMP (Abb. 5.10).



**Abb. 5.9: Western-Blot für MT1-MMP**

In den Lysaten der MT1-MMP transduzierten Astrozyten ist das inaktive MT1-MMP die oberste Bande auf einer Höhe von 65 Kilodalton (kDa), das aktive MT1-MMP befindet sich auf Höhe von 60 kDa als mittlere Bande [132, 154]. Darunter ist noch eine starke dritte Bande zu sehen. Die Lysate der MIGR-II transduzierten Astrozyten zeigen ein schwächeres Bandenmuster. Als Ladungskontrolle diente das Haushaltsprotein GAPDH. Bei allen Proben waren 50 µg Protein geladen.



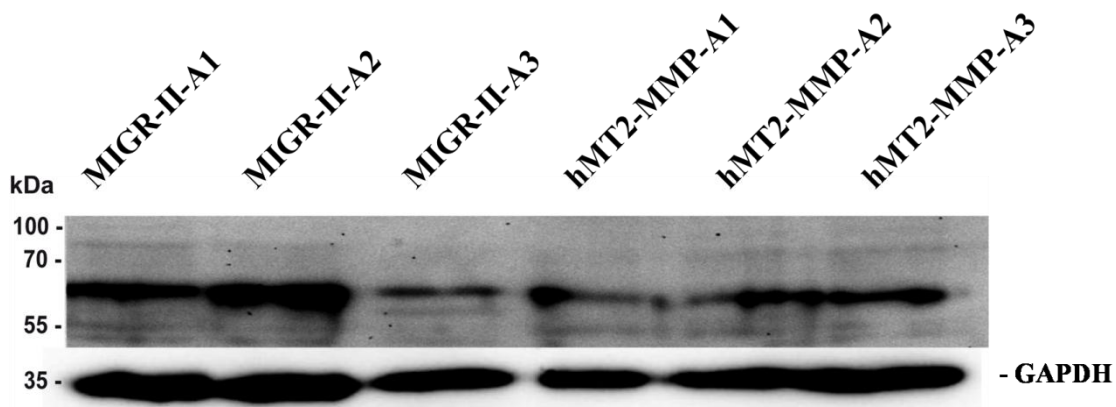
**Abb. 5.10: Intensitätsmessung der MT1-MMP-Banden des Western Blots**

Die Proben der MT1-MMP transduzierten Astrozyten zeigten alle eine höhere mittlere Intensität als die der MIGR-II transduzierten Astrozyten.

Mittlere Intensität = Durchschnittlicher Grauwert aller Pixel/alle Pixel normalisiert auf die Bandenintensität der zugehörigen GAPDH-Bande (siehe Material und Methoden).

#### 5.4.2 MT2-MMP

MT2-MMP-Protein war im Western-Blot nicht nachweisbar. In Abb. 5.11 sind die aufgetragenen Proteinlysate der MIGR-II und MT2-MMP transduzierten Astrozyten zu sehen. Auf der Höhe des Molekulargewichtes von 60-70 kDa ist in allen Proben eine mäßig starke Bande für MT2-MMP zu sehen. Da in den Kontrollastrozyten keine RNA-Expression nachweisbar war, war eine Proteinexpression von MT2-MMP nicht zu erwarten. Daher gehen wir davon aus, dass der Antikörper MT2-MMP im Western Blot nicht adäquat erkennt.

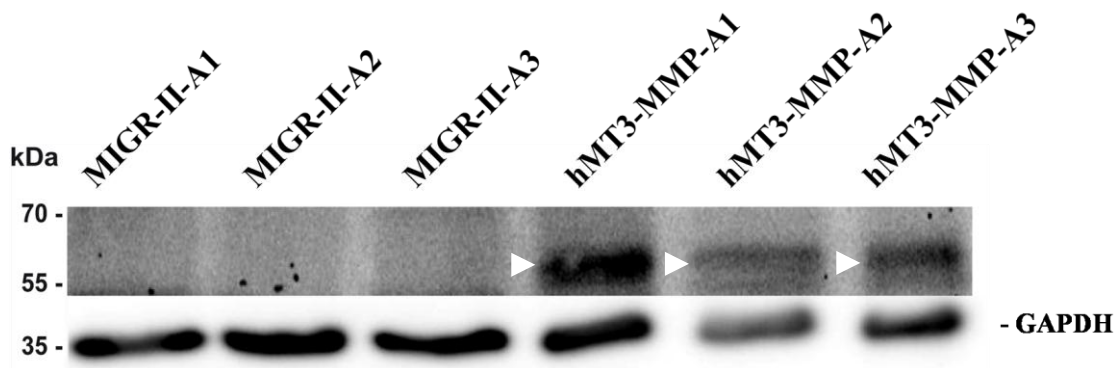


**Abb. 5.11: Western-Blot für MT2-MMP**

Die MIGR-II- und hMT2-MMP-Proben der MIGR-II und MT2-MMP transduzierten Astrozyten zeigen eine mäßig starke Bande im mittleren 60 kDa-Bereich. Die Spezifität dieser Bande ist fraglich (siehe Text). Bei allen Proben waren 50 µg Protein geladen.

#### 5.4.3 MT3-MMP

Beim Nachweis des humanen MT3-MMP Proteins konnte die aktivierte Form mit einem Molekulargewicht von 55 kDa nachgewiesen werden [102]. Bei den MT3-MMP transduzierten Astrozyten war diese Bande detektierbar, wohingegen sie bei den MIGR-II transduzierten Astrozyten fehlte (Abb. 5.12).



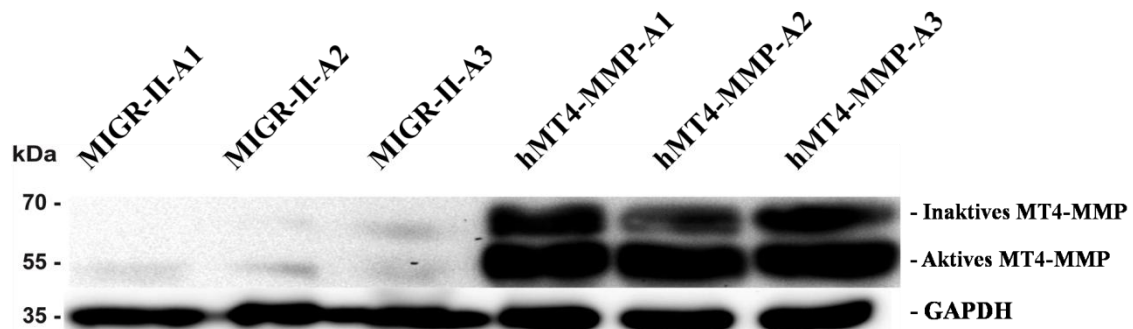
**Abb. 5.12: Western-Blot für MT3-MMP**

Das aktive MT3-MMP liegt auf einer Höhe von 55 kDa (Pfeile). Als Ladungskontrolle diente GAPDH, welches bei der hMT3-MMP-A2- und hMT3-MMP-A3-Probe eine etwas geringe Proteinbeladung anzeigt. Bei allen Proben waren eigentlich 50 µg Protein geladen.

#### 5.4.4 MT4-MMP

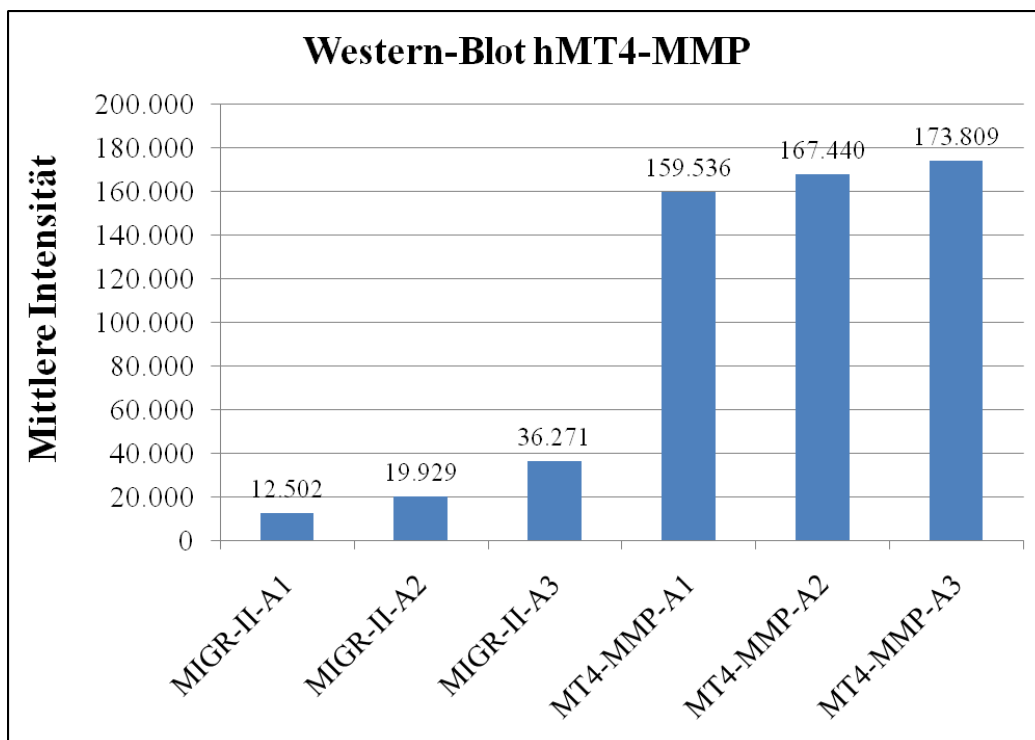
Die Lysate der MT4-MMP transduzierten Astrozyten zeigten im Vergleich zu den mit Leervektor transduzierten Astrozyten eine wesentlich stärkere Expression des MT4-MMP (Abb. 5.13). Da auch bei den Proben der MIGR-II transduzierten Astrozyten Banden sichtbar waren, wurde die mittlere Intensität bestimmt, um die Expressionshöhe

vergleichen zu können. Dies ergab eine 7,5fach höhere Expression des MT4-MMP in den MT4-MMP transduzierten Astrozyten gegenüber den MIGR-II transduzierten Astrozyten (Abb. 5.14). Eigentlich ist eine Detektion von MT4-MMP in den MIGR-II transduzierten Astrozyten nicht zu erwarten, da diese Astrozyten keine MT4-MMP-RNA exprimieren. Es könnte sich hierbei um eine Kreuzreaktivität des Antikörpers mit dem Protein mMT1- oder mMT3-MMP handeln.



**Abb. 5.13: Western-Blot für MT4-MMP**

Das MT4-MMP ist auf Höhe von 50 kDa (aktiv) und 67 kDa (inaktiv) zu sehen [102]. Als Ladungskontrolle diente GAPDH. Bei allen Proben waren 50 µg Protein geladen.

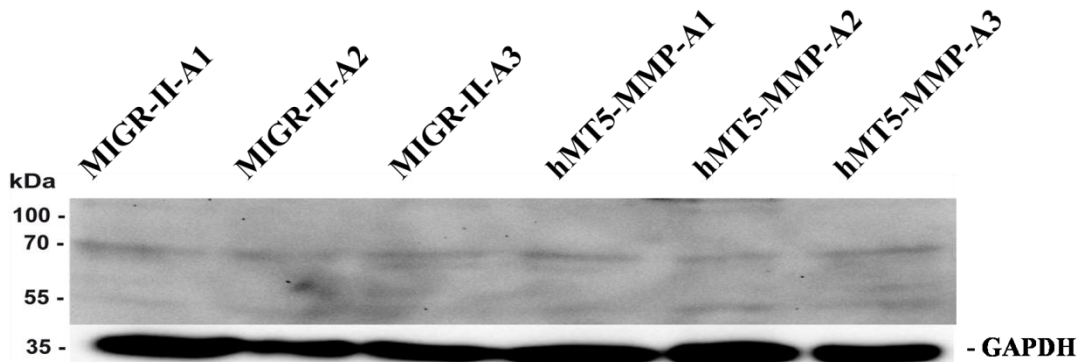


**Abb. 5.14: Intensitätsmessung der MT4-MMP-Banden des Western Blots**

Die Intensität wurde über alle Banden des MT4-MMP gemessen und an den GAPDH-Wert des MIGR-II-A1 adaptiert. Die Proben der MT4-MMP transduzierten Astrozyten zeigten alle eine höhere mittlere Intensität. Mittlere Intensität= Durchschnittlicher Grauwert aller Pixel/alle Pixel normalisiert auf die Bandenintensität der zugehörigen GAPDH-Bande (siehe Material und Methoden).

#### 5.4.5 MT5-MMP

MT5-MMP-Protein war im Western-Blot mit den verwendeten Antikörpern nicht nachweisbar (Abb. 5.15).

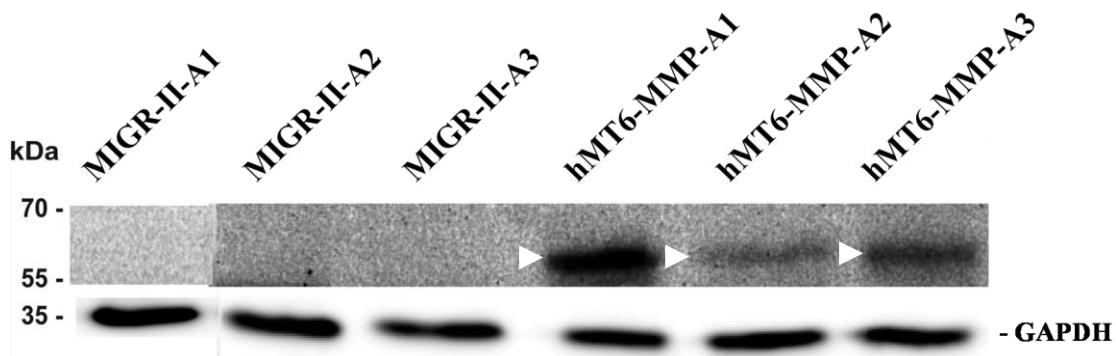


**Abb. 5.15: Western-Blot für MT5-MMP**

Für MIGR-II- und hMT5-MMP-Proben der MIGR-II und MT5-MMP transduzierten Astrozyten ist das gleiche Bandenmuster zu sehen. Als Ladungskontrolle diente GAPDH. Bei allen Proben waren 50 µg Protein geladen.

#### 5.4.6 MT6-MMP

Das MT6-MMP konnte in allen Lysaten der MT6-MMP transduzierten Astrozyten nachgewiesen werden, wohingegen die mit Leervektor transduzierten Astrozyten keine Expression zeigten (Abb. 5.16). Ob MT6-MMP aktiv oder inaktiv ist, konnte aufgrund des Fehlens einer zweiten Bande im Western-Blot nicht beurteilt werden.



**Abb. 5.16: Western Blot für MT6-MMP**

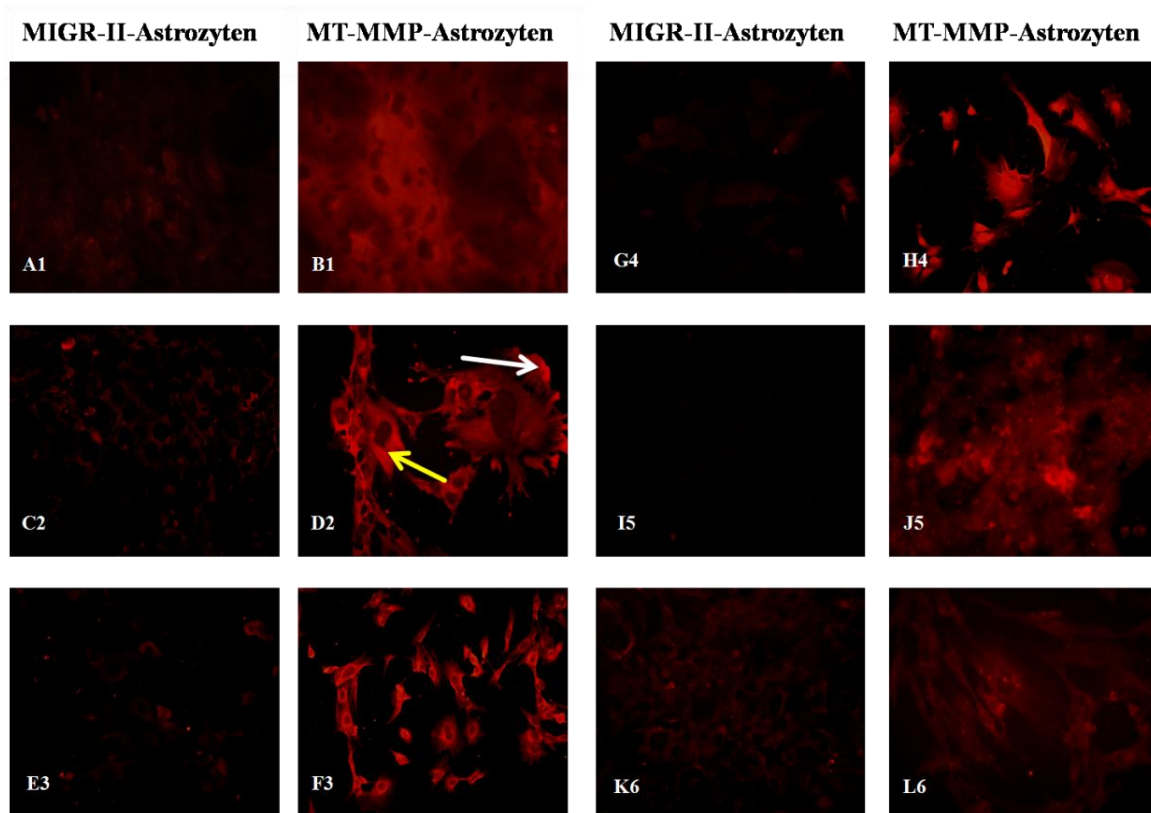
Auf der Höhe von 58 kDa ist MT6-MMP (Pfeile) in den Lysaten der MT6-MMP transduzierten Astrozyten zu sehen [102], wohingegen die MIGR-II transduzierten Astrozyten keine Expression zeigten. Als Ladungskontrolle diente das Haushaltsprotein GAPDH. Bei allen Proben waren 50 µg Protein geladen.



### 5.5 Immunzytochemie für die humanen MT-MMPs in den Astrozyten

Mit der Immunzytochemie wurden die hMT-MMPs mit spezifischen Antikörpern direkt im Zytosol oder auf der Oberfläche der Astrozyten der Zellreihe A1 dargestellt. Alle hMT-MMP transduzierten Astrozyten fluoreszierten in der Immunzytochemie wesentlich stärker als die MIGR-II transduzierten Astrozyten (Abb. 5.17).

Zum Nachweis, dass es sich bei den detektierten Signalen um eine MT-MMP spezifische Anfärbung handelte, wurde bei jeder Färbung zur Kontrolle das gleiche Protokoll unter Weglassen des Primärantikörpers durchgeführt. Hierbei zeigte sich keine Fluoreszenz, sodass die Signale als spezifisch zu werten sind.



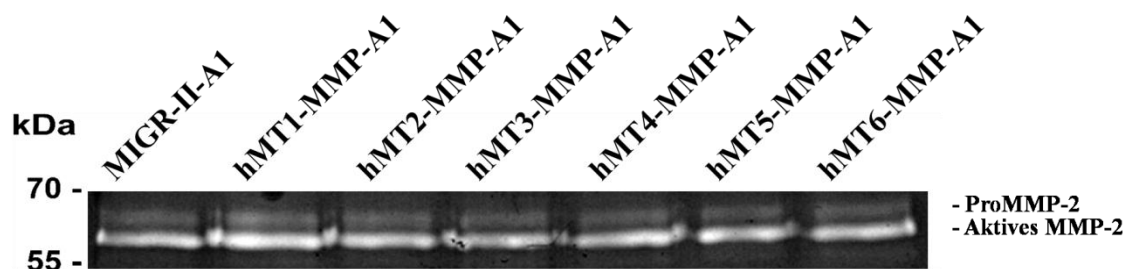
**Abb. 5.17: Immunzytochemischer Nachweis für die hMT-MMPs in murinen Tp53<sup>-/-</sup>-Astrozyten.**

Zu sehen sind jeweils die mit dem MIGR-II transduzierten Astrozyten (A, C, E, G, I, K) sowie die hMT-MMP transduzierten Astrozyten (B (MT1-MMP), D (MT2-MMP), F (MT3-MMP), H (MT4-MMP), J (MT5-MMP), L (MT6-MMP)). Die Belichtungszeit, sowie Kontrast- und Helligkeitseinstellungen waren bei Kontrollvektor und hMT-MMP transduzierten Astrozyten gleich. Die Zahlen 1-6 entsprechen den Antikörpern gegen humanes MT1-MT6-MMP. Der weiße Pfeil deutet beispielhaft bei den MT2-MMP transduzierten Astrozyten (D2) auf die Anfärbung von membranständigen hMT-MMP hin, der gelbe Pfeil auf die Anfärbung von zytosolischen hMT-MMP.

## 5.6 Gelatin-Zymographie

In der Gelatin-Zymographie, die die Aktivität der MT-MMP indirekt abbilden sollte, zeigten sich in den konditionierten Überständen der transduzierten Astrozyten keine Unterschiede zwischen den mit MIGR-II und den hMT-MMP transduzierten Astrozyten (Abb. 5.18). Die mittlere Intensität wurde für die proMMP-2 und MMP-2 Bande bestimmt und war bei MIGR-II und hMT-MMPs vergleichbar (s. Abb. 5.19 unten).

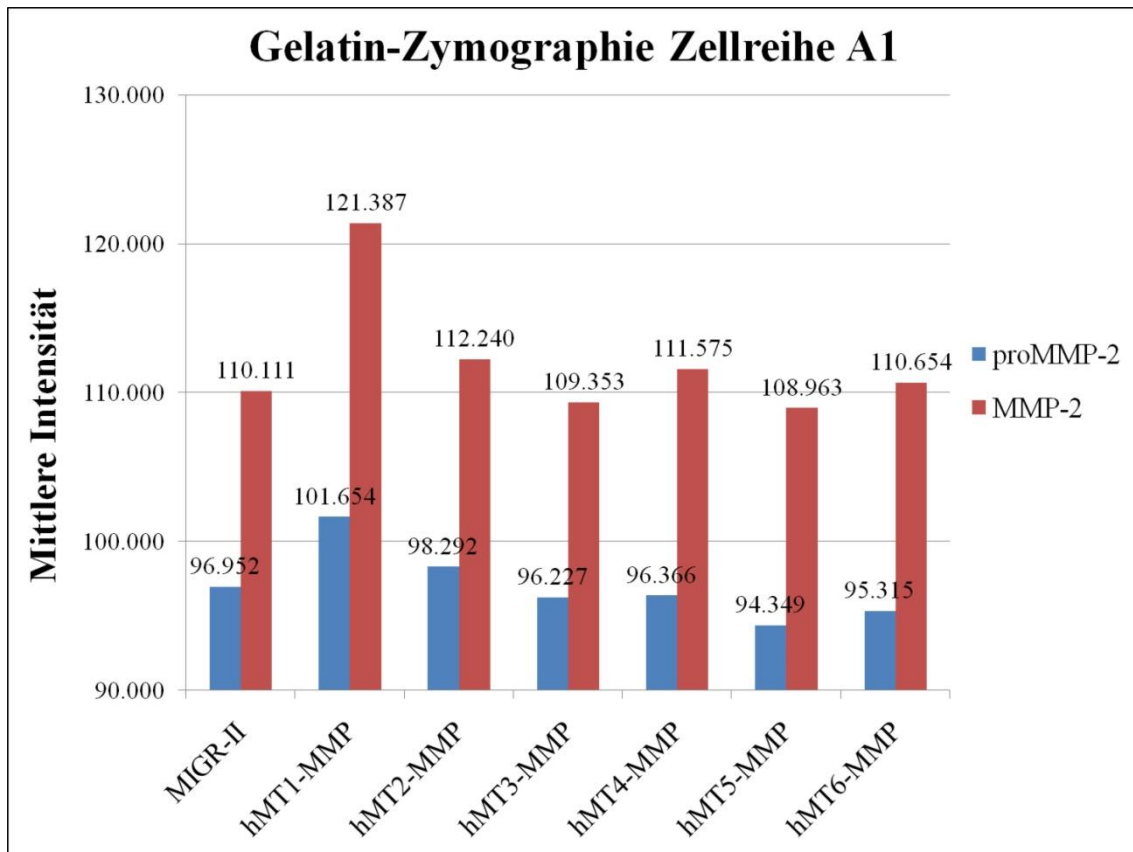
In dem Säulendiagramm wird zudem deutlich, dass dort wo mehr proMMP-2 detektiert wurde, auch mehr aktives MMP-2 nachgewiesen werden konnte (Abb. 5.19). Schon in den Kontrollen lag dieses aktive MMP-2 in großen Mengen vor. Da die Gelatin-Zymographie der Kulturüberstände der murinen Astrozyten keine Mehraktivierung des MMP-2 im Vergleich der hMT-MMP transduzierten und zu den MIGR-II transduzierten Astrozyten zeigte, wurde das System humanisiert.



**Abb. 5.18: Gelatin-Zymographie mit konditionierten Überständen der transduzierten Astrozyten.**

Auf der Abbildung sind zwei Banden zu sehen: Die obere Bande stellt den Nachweis des inaktiven (68 kDa) und die untere Bande den des aktiven MMP-2 dar (64 kDa) [132, 157].





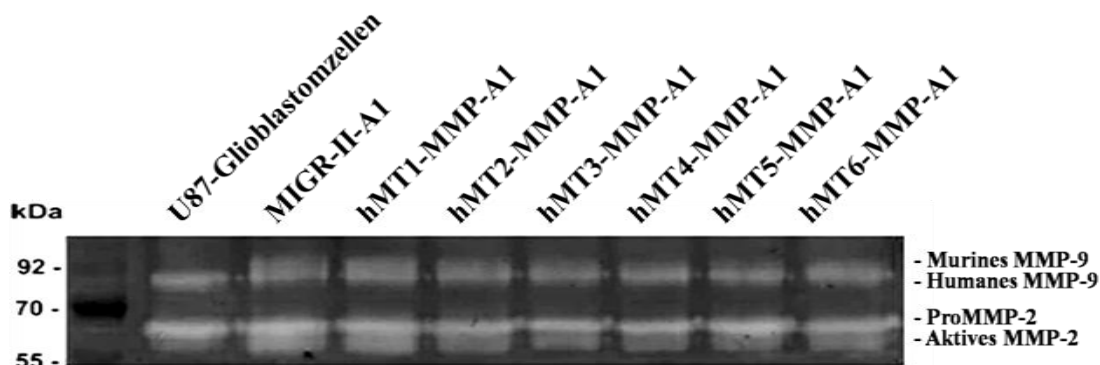
**Abb. 5.19: Intensitätsmessung der Gelatin-Zymographie**

Die mittlere Intensität unterschied sich zwischen den Proben nur leicht. Nur das MT1-MMP zeigte deutlich mehr proMMP-2 und MMP-2. Wie in dem Diagramm zu sehen ist, schwankt die Höhe des aktiven MMP-2 mit der Expressionshöhe des proMMP-2.

Mittlere Intensität= Durchschnittlicher Grauwert aller Pixel/alle Pixel

Da es sein könnte, dass die humanen MT-MMPs das murine MMP-2 nicht aktivieren können. Daher wurden humane U87-Glioblastomzellen dazu genutzt, konditionierte Überstände mit humanem MMP-2 zu gewinnen. Dieser Überstand (Spur 1 Abb. 5.20) wurde für 48 h auf die transduzierten Astrozyten gegeben und anschließend für die Gelatin-Zymographie abgenommen.

Aber auch in dem humanisierten System war kein Unterschied zwischen den MIGR-II und hMT-MMP transduzierten Astrozyten festzustellen, sodass weder das humane noch das murine MMP-2 von den hMT-MMPs aktiviert wurde (Abb. 5.18 und Abb. 5.20). Dies liegt eventuell daran, dass schon die Überstände der nur mit dem MIGR-II transduzierten Astrozyten das inaktive MMP-2 der U87-Überstände aktivieren. Dagegen ist in den U87-Überständen nur wenig aktives MMP-2 zu finden. Ein Unterschied war daher nicht darstellbar.



**Abb. 5.20: U87-Gelatin-Zymographie**

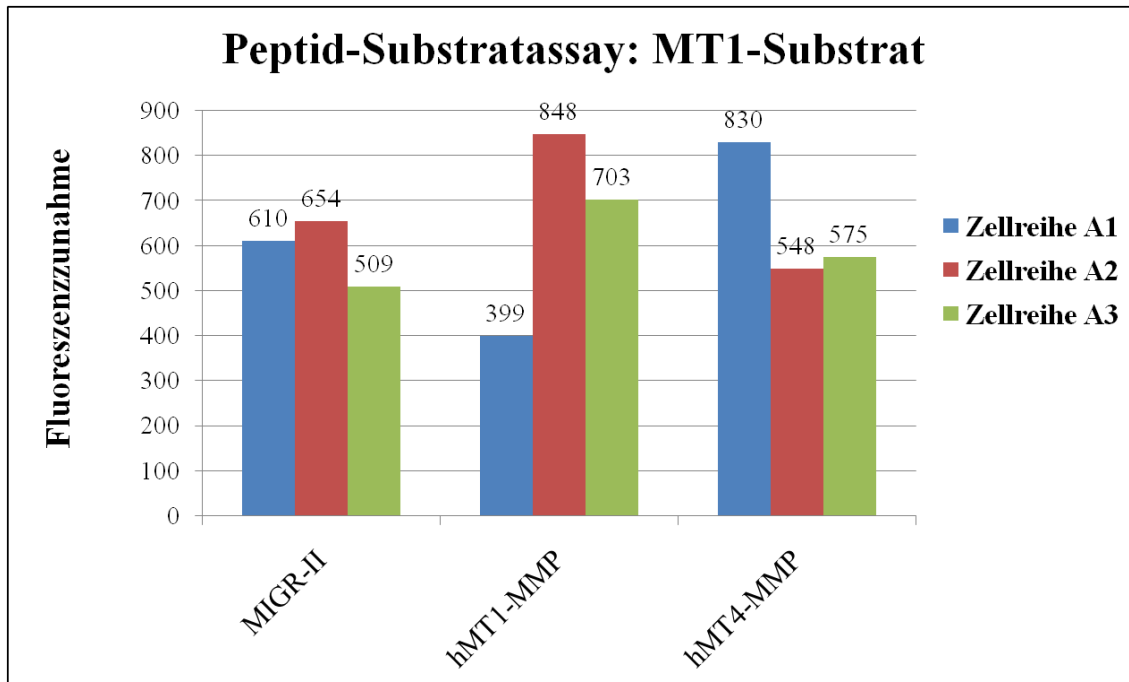
Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den MIGR-II und MT-MMP transduzierten Astrozyten (Spur 2-8). Auf Spur 1 ist der U87-Glioblastomzellen-Überstand zu sehen. Zusätzlich zum aktiven humanen MMP-9 (82 kDa) erschien aktives murines MMP-9 (95 kDa) [23, 43, 65, 123]. Die Bande des aktiven MMP-2 ist in den MIGR-II- und hMT-MMP-Astrozyten stärker als bei den U87-Glioblastomzellen [24, 132].

## 5.7 Peptid-Substratassay mit fluorogenen Substraten für humanes MT1- und MT4-MMP

Da die hMT-MMP-Aktivität in Bezug auf eine Aktivierung von proMMP2 in der Gelatin-Zymographie nicht darstellbar war, wollte ich die Aktivität mit Hilfe von verschiedenen Substraten für die MT-MMPs nachweisen. Das Substrat enthielt ein fluorogenes Molekül, welches Fluoreszenz emittierte, nachdem es von einer Protease gespalten worden war. Diese Fluoreszenzzunahme wurde jeweils 120 Min. lang in 60 Messschritten photometrisch erfasst.

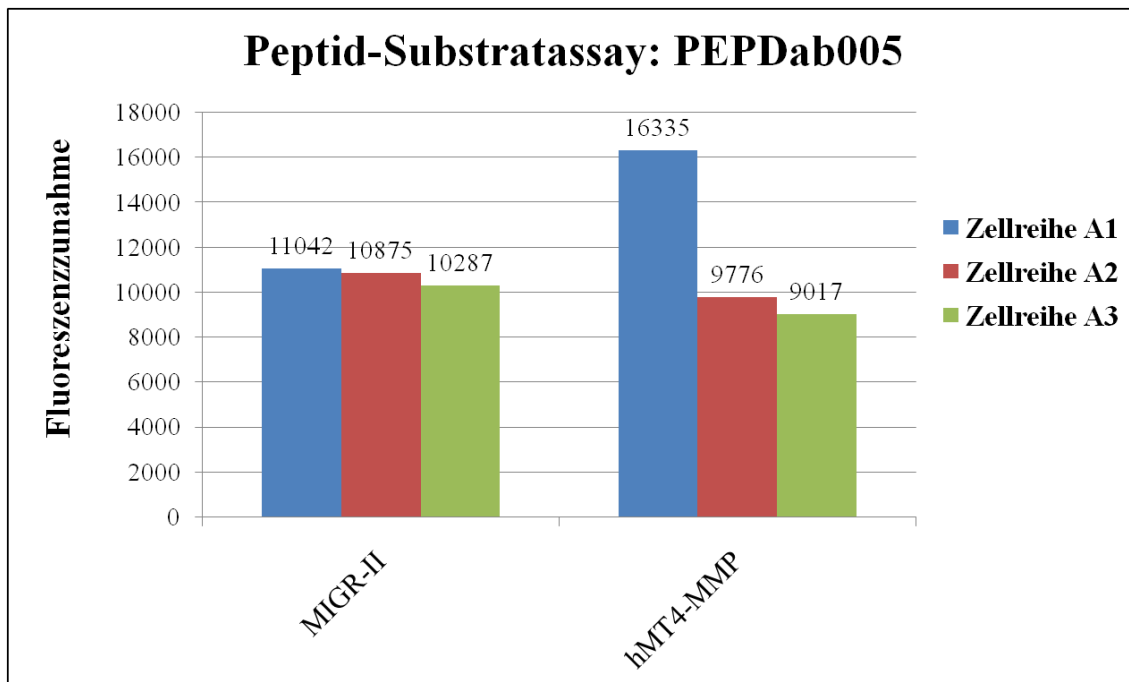
Die Fluoreszenz wurde für die Substrate PEPDab005 und PEPDab008 bei einer Exzitation von 485 nm und Emission von 530 nm gemessen, für das MT1-Substrat bei einer Exzitation von 330 nm und Emission von 485 nm.

In Abb. 5.21-23 ist die Fluoreszenzzunahme der einzelnen Lysate nach 120 Min. dargestellt. Die Lysate der hMT-MMP transduzierten Astrozyten zeigten bei Betrachtung aller drei Zellreihen keine verwertbaren Unterschiede in der Zunahme der Fluoreszenz zu Lysaten der MIGR-II transduzierten Astrozyten. Auch hier scheint bereits konstitutiv eine hohe Proteaseaktivität vorzuliegen, so dass die relativ unspezifischen Substrate von anderen Proteasen als den untersuchten MT-MMPs gespalten werden und damit fluoreszieren.



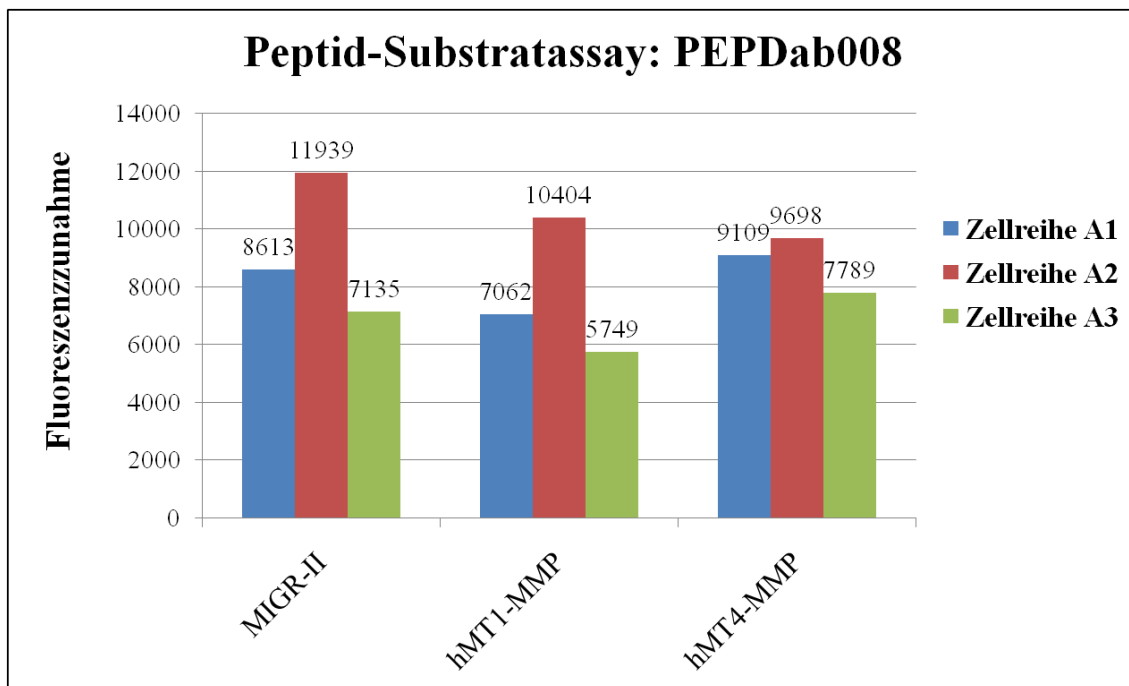
**Abb. 5.21: Ergebnisse des Peptid-Substratassays mit dem MT1-Substrat**

In dem Substratassay wurde die Fluoreszenzzunahme über 120 Minuten gemessen. Pro Zellreihe wurden jeweils drei Werte pro Zelltyp gemessen und anschließend gemittelt. Über alle drei Zellreihen konnte kein vermehrter Verdau durch die Lysate der MT-MMP transduzierten Astrozyten detektiert werden.



**Abb. 5.22: Ergebnisse des Peptid-Substratassays mit PEPDab005 (TNF- $\alpha$ )**

In dem Substratassay wurde die Fluoreszenzzunahme über 120 Minuten gemessen. Pro Zellreihe wurden jeweils drei Werte pro Zelltyp gemessen und anschließend gemittelt. Über alle drei Zellreihen konnte kein vermehrter Verdau durch die Lysate der MT4-MMP transduzierten Astrozyten detektiert werden.



**Abb. 5.23: Ergebnisse des Peptid-Substratassays mit PEPDab008 (proCha)**

In dem Substratassay wurde die Fluoreszenzzunahme über 120 Minuten gemessen. Pro Zellreihe wurden jeweils drei Werte pro Zelltyp gemessen und anschließend gemittelt. Über alle drei Zellreihen konnte kein vermehrter Verdau durch die Lysate der MT-MMP transduzierten Astrozyten detektiert werden

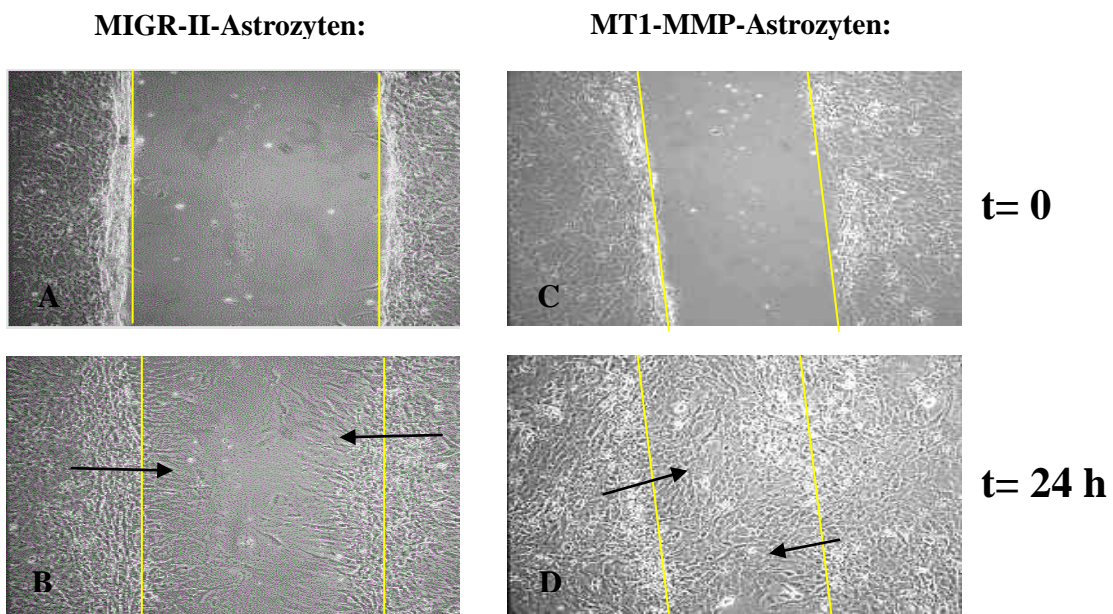
## 5.8 Migrations- und Invasionsassays

### 5.8.1 Scratch-Assay

Mit dem *Scratch*-Assay wird die Migration von Zellen in einen Kratzer im Zellrasen quantifiziert. Dieser Assay wurde mit allen hMT-MMP und MIGR-II transduzierten Astrozyten jeder Zellreihe durchgeführt. Pro Zellreihe wurden zwei Versuche angesetzt, bei denen je Versuch die Anzahl der in den *Scratch* eingewanderten Astrozyten auf jeweils fünf Bildern ausgewertet wurde. Daraus ergaben sich 30 Einzelwerte für die hMT-MMP und MIGR-II transduzierten Astrozyten aller Zellreihen.

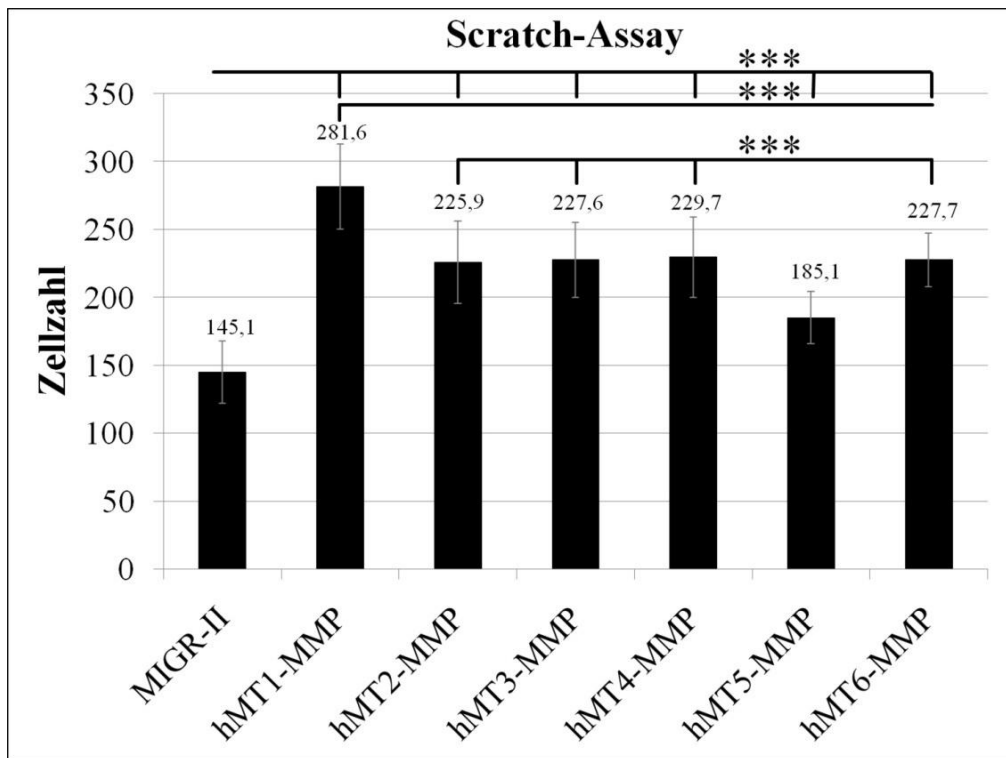
Auf Abb. 5.24 sieht man, wie ein *Scratch* gesetzt wurde und nach 24 Stunden die Astrozyten von der *Scratch*-Grenze in den *Scratch* eingewandert sind. Da die gemessenen Werte normalverteilt waren, konnte eine Varianzanalyse durchgeführt werden. Die statistische Analyse zeigte, dass alle hMT-MMPs die Migration der Astrozyten gegenüber der Kontrolle (MIGR-II transduzierte Astrozyten) signifikant ( $p < 0,001$ ) steigerten (Abb. 5.25). Zudem waren auch zwischen den MT-MMP

transduzierten Zellen Unterschiede festzustellen: So migrierten die MT1-MMP transduzierten Astrozyten gegenüber allen anderen hMT-MMP transduzierten Astrozyten signifikant (alle  $p < 0,001$ ) stärker. Die Migration der MT2-, MT3-, MT4- und MT6-MMP transduzierten Astrozyten war signifikant erhöht ( $p < 0,001$ ) im Vergleich zu den MT5-MMP transduzierten Astrozyten.



**Abb. 5.24: Scratch-Assay**

MIGR-II und MT1-MMP transduzierte Astrozyten an Tag 0 (A, C) und nach 24 Stunden (B, D) (Phasenkontrastmikroskop, 100x). Auf Bild A und C sieht man die *Scratch*-Ränder markiert durch die gelben Linien. Von diesen Rändern aus wanderten die Astrozyten in den *Scratch* ein (B, D). Die Pfeile markieren die Wanderungsrichtung.



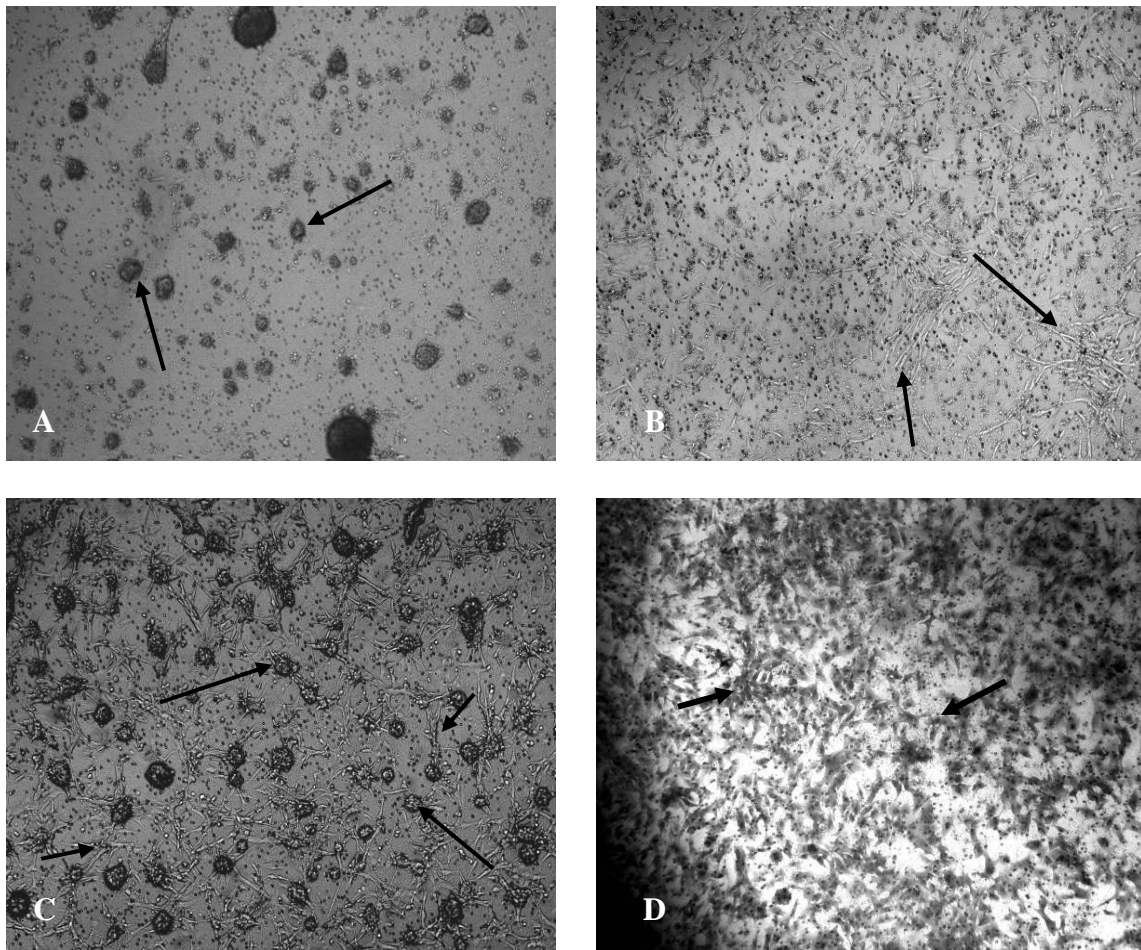
**Abb. 5.25: Gesamtergebnis aller sechs Messungen des Scratch-Assays**

In sechs Einzelmessungen wurden 30 Werte für jedes MT-MMP und die Kontrolle (MIGR-II) ermittelt. Dargestellt sind die Gesamtmittelwerte und die jeweiligen Standardabweichungen. Alle Einzelmessungen waren in der Varianzanalyse im Vergleich zur Kontrolle signifikant (\*\*\*) ( $p < 0,001$ ). Zudem war im Tukey-Test die Migration durch MT1-MMP signifikant im Vergleich zu allen anderen MT-MMPs und durch MT2-, MT3-, MT4- und MT6-MMP signifikant gegenüber MT5-MMP erhöht.

### 5.8.2 Matrigel-Invasions-Assay

Mit dem Matrigel-Invasions-Assay sollte die Invasivität der transduzierten Astrozyten untersucht werden.

Es stellte sich heraus, dass die Astrozyten nur in sehr geringem Maße an die Unterseite der Membran des Matrigels gewandert waren, da die meisten auf der Membran entweder abstarben oder Sphären bildeten. Im Vergleich dazu zeigte sich bei den U87-Glioblastomzellen eine starke Migration und Invasion im Matrigel (Abb. 5.26). Zudem adhärten die Astrozyten an der Oberfläche der Matrigel-Matrix und schienen diese, nicht zu invadieren. Dies wurde aber nicht abschließend untersucht.



**Abb. 5.26: MT1-MMP transduzierte Astrozyten und U87-Glioblastomzellen auf der Membran und dem Matrigel**

A: Haufen (Pfeile) von abgestorbenen Astrozyten oder aus Astrozyten gebildeten Sphären auf der Oberseite der Membran ohne Matrigel, die trotz gleichmäßiger Verteilung auf der ganzen Membran zu sehen sind (Phasenkontrastmikroskop, 50x).

B: Ausbreitung der Astrozyten auf der Matrigeloberfläche (Phasenkontrastmikroskop, 50x)

C: Neben den Zellhaufen abgestorbener Zellen an der Oberseite der Membran (lange Pfeile) sind vitale U87-Glioblastomzellen zu sehen (kurze Pfeile) (Phasenkontrastmikroskop, 50x)

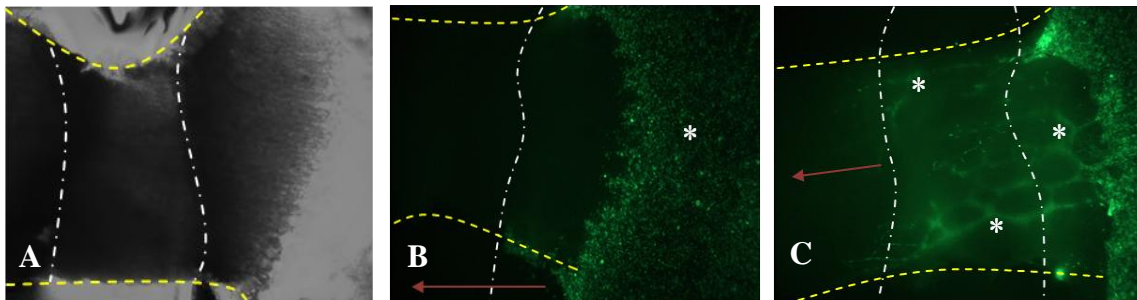
D: An der Unterseite der Membran durch das Matrigel durchgewanderte U87-Zellen (Pfeile) (Phasenkontrastmikroskop, 50x)



### 5.8.3 Der OPoSSM-Assay

#### 5.8.3.1 Astrozytenmigration im OPoSSM-Assay

Neben der Untersuchung des Einflusses der humanen MT-MMP auf die Migrationsfähigkeit von Astrozyten war es Ziel dieser Arbeit, eine neue Methode zu etablieren, die es ermöglichte, Astrozyten in ZNS-Gewebe zu untersuchen. Hierfür wurde Rückenmark vom Schwein genutzt, welches sich zur Präparation von 300 µm dicken Rückenmarksschnitten als besonders geeignet erwies (Abb. 5.27).



**Abb. 5.27: Aufbau und Verlauf des OPoSSM-Assay**

A (25 x) zeigt, wie ein Rückenmarksschnitt auf der Membran mit Agar präpariert ist. In Bild

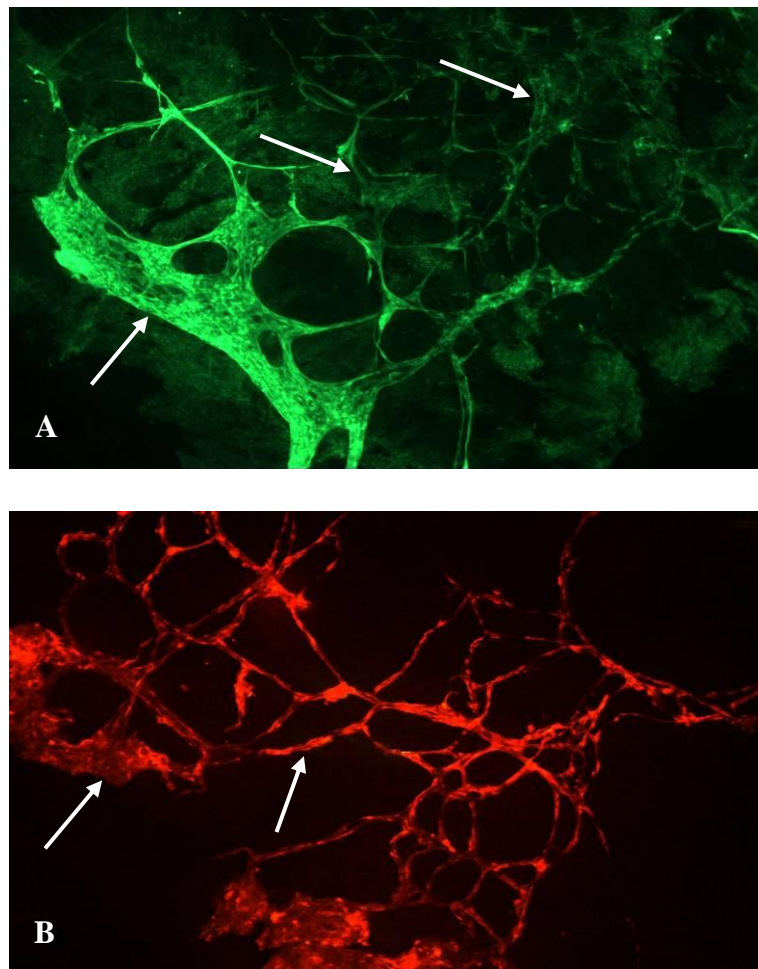
B (25 x) sieht man die vor dem Rückenmarksschnitt pipettierte Astrozyten und in Bild

C (25 x) die in den Rückenmarksschnitt eingewanderten Astrozyten nach einer Woche.

Die weiß gestrichelte Linie stellt die Agargrenze, die gelb gestrichelte Linie die Rückenmarksschnittgrenze und der rotbraune Pfeil die Wanderungsrichtung dar. Der weiße Stern markiert auf Bild B die vor den Rückenmarksschnitt pipettierte Astrozyten, in Bild C markieren die weißen Sterne die im Rückenmarksschnitt gebildeten Astrozytenketten.

Die Astrozyten wanderten nicht als einzelne Zellen sondern kettenförmig miteinander verbunden in die Rückenmarksschnitte ein und bildeten wabenartige Netzwerke aus. Die miteinander kommunizierenden Ketten waren von unterschiedlicher Breite und Länge und erstreckten sich über den ganzen Schnitt. Diese Morphologie zeigte sich bei allen hMT-MMP transduzierten Astrozyten und auch bei den MIGR-II transduzierten Astrozyten (Abb. 5.28). Die U87-Glioblastomzellen verhielten sich ähnlich, denn sie bildeten auch kettenförmige Netzwerke (Abb. 5.28).

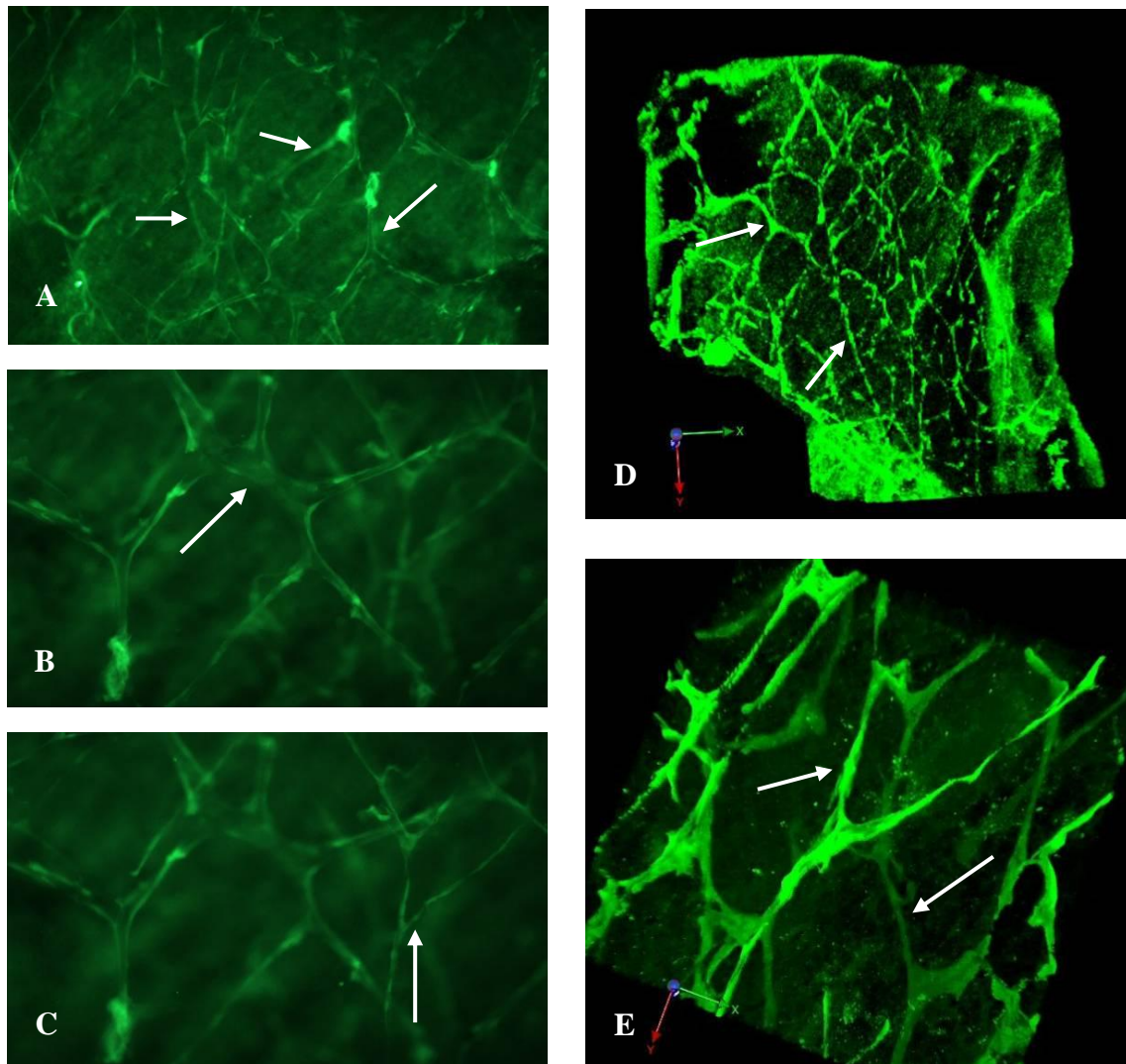




**Abb. 5.28: Rückenmarksschnitt in der Fluoreszenzdarstellung**

Auf der Abbildung A und B sieht man den Beginn von zwei Rückenmarksschnitten, in die hMT6-MMP transduzierte Astrozyten (A) bzw. die U87-Glioblastomzellen (B) über einen Zeitraum von einer Woche eingewandert sind. Im Anfangsteil der Rückenmarksschnittes haben sich große Zellkonglomerate (Pfeile) gebildet, von denen sich zahlreiche Ketten in den weiteren Rückenmarksschnitt spannen (A). Wie die Astrozyten organisierten sich auch die Glioblastomzellen als Ketten und wanderten so in den Rückenmarksschnitt ein (B).

Diese Astrozytenketten bildeten sich nicht nur in einer Ebene, sondern in vielen Schichten des Rückenmarkschnittes (Abb. 5.29). Um die Wanderung der Astrozyten auf den einzelnen Ebenen besser erfassen zu können, wurde eine konfokale Mikroskopie am Institut für Zytobiologie, Marburg, durchgeführt. Mithilfe der konfokalen Mikroskopie konnten die Astrozytenketten im dreidimensionalen Zusammenhang dargestellt werden. Diese Untersuchung ergab, dass die Astrozyten dreidimensionale, käfigartige Strukturen innerhalb des Rückenmarkschnittes bildeten (Abb. 5.29).



**Abb. 5.29: Darstellung unterschiedlicher Ebenen im Rückenmarksschnitt**

Die Bilder A-C entstanden im normalen Fluoreszenzmodus durch Durchfokussieren mittels des Mikroskops, Bild D und E wurden durch die konfokale Mikroskopie erstellt.

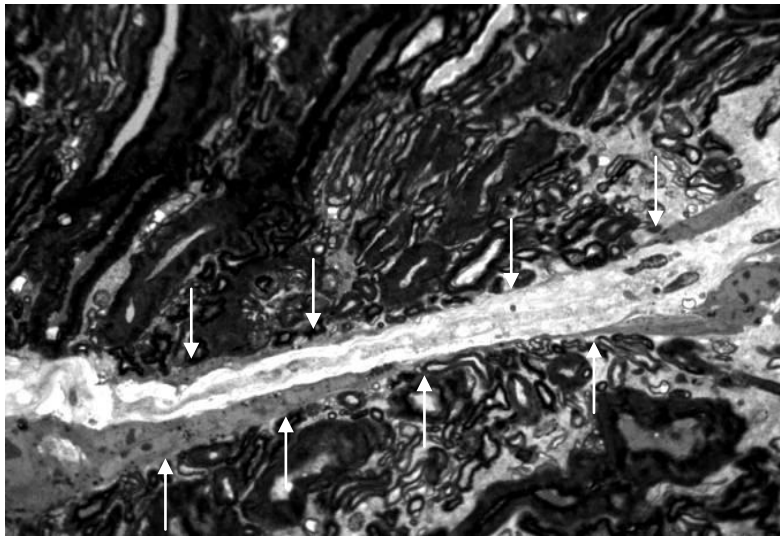
Auf den fünf Bildern wird verdeutlicht, dass die Zellketten in mehreren Ebenen vorhanden waren. In Bild A ist der Blick auf ein solches Netzwerk auf allen Ebenen zu sehen (Pfeile). Aufnahme B und C zeigen das gleiche Bildfeld, wobei der Fokus von oben nach unten verändert wurde. Dabei sieht man, dass unter der oberen Ebene auf einer weiteren Ebene noch weitere Ketten erscheinen (Pfeile).

Mittels der konfokalen Mikroskopie (D 50x, E 200x) konnte die dreidimensionale Ausbreitung der Astrozytenketten bestätigt werden (D). Die Pfeile markieren auf Bild E zwei Astrozytenketten auf unterschiedlichen Ebenen. (E, Pfeile).

Zusätzlich wurde die Morphologie der Astrozytenmigration in die Rückenmarksschnitte anhand von Semidünnschnitten untersucht.

In diesen war erkennbar, dass die Astrozyten in den meisten Fällen entlang von der Basallamina von Gefäßen migrierten und dort durch Interaktion mit anderen Astrozyten die beobachteten Ketten bildeten. Dieses Muster war unabhängig davon, ob es sich um MIGR-II oder hMT-MMP transduzierte Astrozyten handelte, zu beobachten (Abb.

5.30).



**Abb. 5.30: Semidünnschnitt eines Rückenmarkschnittes**

In der Mitte des Bildes sieht man, wie sich zwei Astrozytenketten (Pfeile) entlang eines Gefäßes (kontrastarme Struktur in der Mitte der Abbildung) gebildet haben (Phasenkontrastmikroskop 100x).

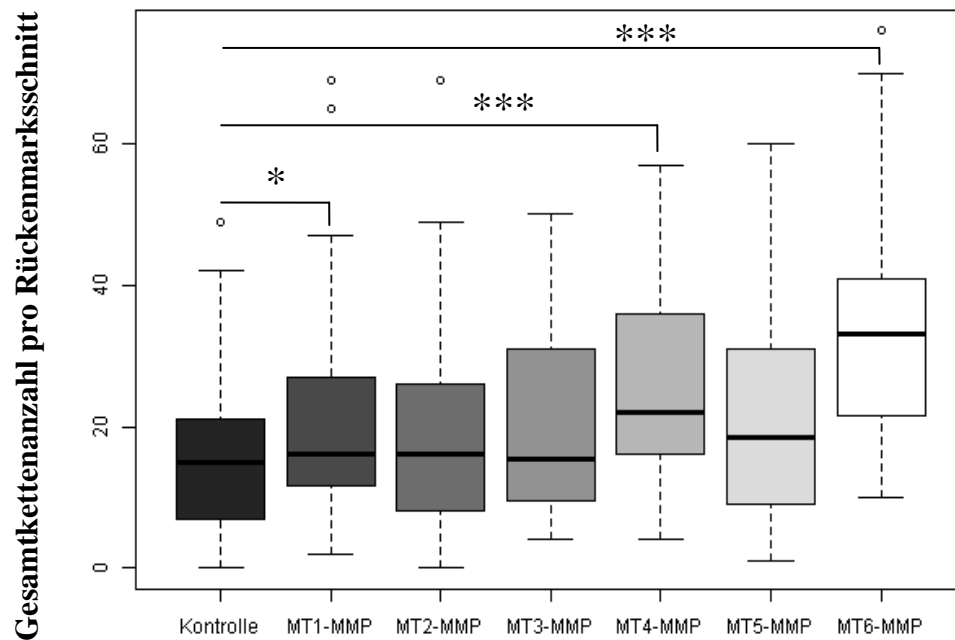
#### 5.8.3.2 Migrationsauswertung

Die Auswertung der Migration der transduzierten Astrozyten in die Rückenmarksschnitte erfolgte unter dem Leica CTR-6000 bei einer Vergrößerung von 200x und 400x. Die Auszählung wurde verblindet von vier verschiedenen Personen durchgeführt, was eine objektive Beurteilung gewährleisten sollte.

Es zeigte sich bei der statistischen Auswertung mittels der Varianzanalyse, dass die Ergebnisse in den einzelnen Zellreihen in der doppelblinden Auszählung reproduzierbar waren. Die Faktoren dieser Varianzanalyse waren die Gesamtkettenanzahl und die Infiltrationstiefe der MT-MMP-Spezies. In Verknüpfung zum ANOVA-Test wurde ein Tukey Range Test angeschlossen.

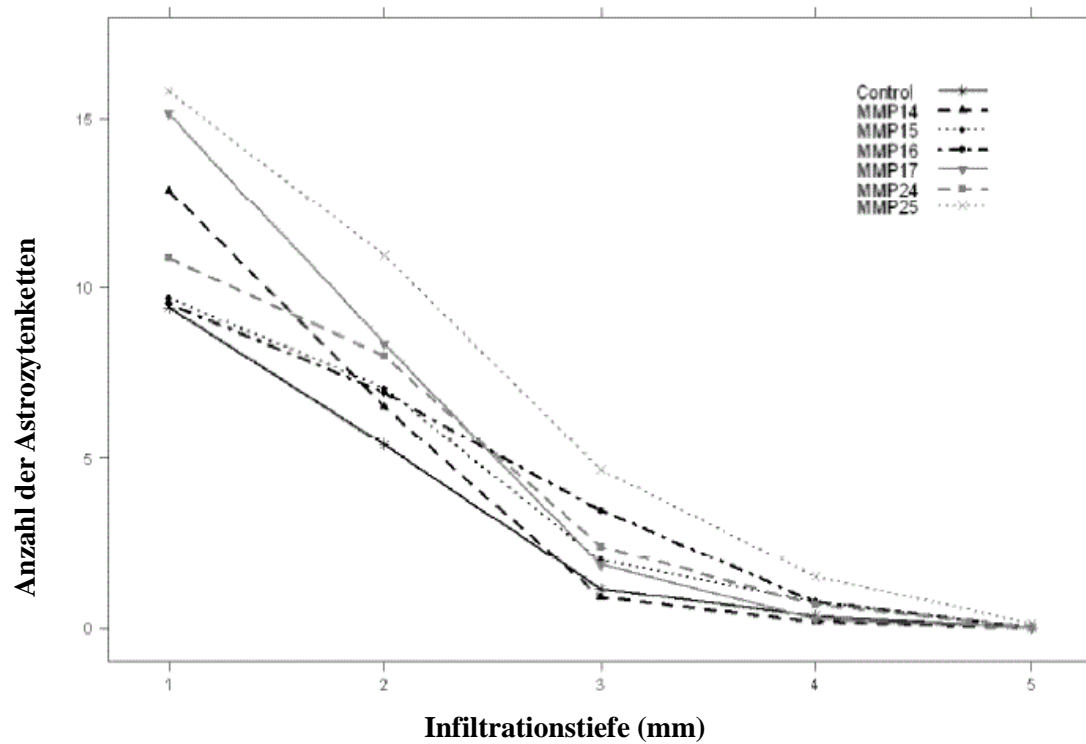
Alle hMT-MMP transduzierten Astrozyten wiesen eine höhere migratorische Aktivität als die MIGR-II transduzierten Astrozyten auf. Die Migration der MT4- und MT6-MMP transduzierten Astrozyten war bei Betrachtung der Gesamtkettenanzahl und Infiltrationstiefe im Vergleich zu den MIGR-II transduzierten Astrozyten signifikant erhöht. MT1-MMP verstärkte die Migration der Astrozyten vor allem in den ersten beiden Millimetern im Bezug auf die Gesamtkettenanzahl signifikant. Alle anderen hMT-MMP transduzierten Astrozyten zeigten gegenüber den MIGR-II transduzierten Astrozyten zwar eine stärkere Migration, die jedoch kein Signifikanzniveau erreichte.

In Abbildung 5.31 ist das Ergebnis der ausgezählten Gesamtkettenanzahl im Boxplot mit Signifikanzniveau und in Abbildung 5.32 die Infiltrationstiefe (Auszählung der Astrozytenketten bei Millimeter 1-5 des Rückenmarksschnittes) im Verlauf dargestellt. Das Kapitel 7.6 im Anhang zeigt beispielhaft eine Auszählung der Zellreihe A3.



**Abb. 5.31: Boxplot der Gesamtkettenanzahl**

Dargestellt sind die Ergebnisse der A2- und A3-Zellreihe als Boxplot der Gesamtkettenanzahl pro Rückenmarksschnitt. Die stärkste Migration zeigten MT1-, MT4- und MT6-MMP. (\*=  $p < 0,05$ , \*\*=  $p < 0,005$ , \*\*\*=  $p < 0,0005$ ).



**Abb. 5.32: Infiltrationstiefe der Astrozytenketten**

In dieser Grafik ist die Anzahl der Astrozytenketten bei Millimeter 1-5 dargestellt. Control= Kontrollvektor transduzierte Astrozyten, MMP14= MT1-MMP, MMP15= MT2-MMP, MMP16= MT3-MMP, MMP17= MT4-MMP, MMP24= MT5-MMP, MMP25= MT6-MMP.

## 6. Diskussion

### 6.1 Auswahl muriner $Tp53^{-/-}$ -Astrozyten und Transduktion mit Retroviren

In dieser Arbeit sollte der Einfluss der humanen MT-MMPs auf die Migration muriner Astrozyten in verschiedenen Umgebungen untersucht werden.

Nachdem sich Astrozyten aus C57 BL/6-Wildtyp-Mäusen in vorangegangenen Versuchen aufgrund ihrer schlechten Kultivierbarkeit und geringen Transduktionseffizienz als nicht geeignet für die in dieser Arbeit angewandten Methoden erwiesen, wurden primäre murine  $Tp53$ -defiziente Astrozyten für die Untersuchungen herangezogen.

Dies hatte den Vorteil, dass diese Astrozyten zum einen den Astrozytomzellen, die häufig eine  $Tp53$ -Mutation aufweisen, ähnlicher als die Wildtyp-Astrozyten waren [10, 107, 169]. Zum anderen besaßen die homozygoten  $Tp53^{-/-}$ -Astrozyten ein höheres Maß an Widerstandsfähigkeit in Bezug auf die Transduktion und zeigten eine stärkere Proliferationsbereitschaft als die Wildtyp-Zellen. Allerdings bestand bei der Verwendung von  $Tp53^{-/-}$ -Astrozyten das Risiko von Mutationen, die durch die fehlende Regulierung des Zelltods über  $Tp53$  und der daraus resultierenden genetischen Instabilität entsteht [169]. Diese Mutationen äußern sich unter anderem durch eine Aneuploidie des Zellkerns, durch das Fehlen der Kontaktinhibition sowie durch starkes Wachstum und Neigung zur Bildung von Tumoren [9, 169]. Um die Akkumulation von Mutationen möglichst gering zu halten, wurden in dieser Arbeit nur Zellkulturen in frühen Passagen verwendet (Passage 0 bis 12). Alle funktionellen Assays wurden in diesen frühen Passagen durchgeführt, sodass die Ergebnisse auf die Überexpression der hMT-MMPs und nicht auf Spontanmutationen zurückzuführen sein sollten. Zudem zeigten die  $Tp53^{-/-}$ -Astrozyten im Matrigel-Invasions-Assay sowie im OPoSSM-Assay ein den fetalen Astrozyten typisches Verhalten, sodass relevante Veränderungen der Gene der  $Tp53^{-/-}$ -Astrozyten unwahrscheinlich waren.

Bei langfristiger Kultivierung der primären Zellen muss jedoch davon ausgegangen werden, dass es im Verlauf zu Mutationen und damit zu unspezifischen Verlust oder Zugewinn von Eigenschaften der  $Tp53$ -defizienten Zellen kommen kann. Um diese

Limitierung in Folgeversuchen zu vermindern, könnte man mit ausgewählten, kommerziell erhältlichen, permanenten Gliomzelllinien arbeiten, deren Genom weitgehend stabil ist.

Die Transduktionsrate der Astrozyten mit den Retroviren betrug zu Anfang nur 5 %, konnte aber durch die Erhöhung der Polybrene-Konzentration von 4 µg/ml auf 80 µg/ml und durch fetales Serum eines anderen Herstellers (PAA) erhöht werden [78]. So wurde die Transduktionseffizienz auf etwa 60-80 % erhöht.

## 6.2 Expression und Aktivität der humanen MT-MMP

Um die Expression und die Funktion der hMT-MMP in den murinen Astrozyten zu evaluieren, wurden verschiedene Verfahren wie der RNase-Protection-Assay, der Western-Blot, die Immunzytochemie, die Gelatin-Zymographie sowie der Peptid-Substratassay verwendet.

### 6.2.1 RNase Protection Assay

Die in der RPA dargestellten Banden zeigten neben den konstitutiv exprimierten mMT1- und mMT3-MMP-Banden in den MT-MMP transduzierten Astrozyten einige weitere Banden, die auf die Homologie zwischen den Sonden des mMT-MMP-Probesets mit den hMT-MMP zurück zu führen sind. Diese zusätzlichen Banden waren bei einigen MT-MMP auf der zu erwartenden Höhe zu sehen. In der hMT2-MMP-Probe war jedoch das hybridisierte humane MT2-MMP wesentlich kürzer als die mMT2-MMP-Sonde, da letztere nicht vollständig komplementär zu der humanen MT2-MMP RNA ist.

Insgesamt konnte neben der konstitutiven Expression des murinen MT1- und MT3-MMP keine vermehrte Expression der murinen MT-MMP bei den nicht transduzierten Tp53<sup>-/-</sup>-Astrozyten und MIGR-II-Astrozyten nachgewiesen werden, sodass sich die MIGR-II-Astrozyten als Kontrollastrozyten sehr gut eigneten.

In der zweiten RPA wurde überprüft, ob die humane *mt-mmp* cDNA in die mRNA der hMT-MMP transkribiert wurde. Alle mit einem humanen MT-MMP (hMT-MMP) transduzierten Astrozyten exprimierten sehr große Mengen mRNA des entsprechenden hMT-MMP.

Die konstitutive Expression von mMT1- und mMT3-MMP in den Tp53<sup>-/-</sup>-Astrozyten-, MIGR-II, hMT2-, hMT4-, hMT5- und hMT6-MMP transduzierten Astrozyten war

wiederum aufgrund der hohen Homologien des humanen Probesets zum mMT1- und mMT3-MMP zu sehen.

In der dritten RPA wurden die natürlichen Inhibitoren, die TIMPs (1-4), auf ihre Expression in den nicht transduzierten und den transduzierten Tp53<sup>-/-</sup>-Astrozyten untersucht. In allen Proben zeigten sich gleich hohe Expressionslevel von TIMP-1-3, sodass keine Auf- oder Herunterregulierung der TIMP Gene als Reaktion auf die Expression der hMT-MMP zu beobachten war. Eine Expression von TIMP-4 konnte nicht nachgewiesen werden, obschon es normalerweise im Gehirn exprimiert wird [44]. Diese Expression findet aber nicht in primären glialen Zellen des Gehirns statt [20]. Dagegen wurde TIMP-1 von den Astrozyten verstärkt gebildet, was für den aktivierten Status der Astrozyten spricht, die bei Inflammation oder Verletzung des ZNS vermehrt TIMP-1 exprimieren [98, 113].

Als Alternative zum RPA könnte in Zukunft die qRT-PCR (quantitative Real-Time-PCR) verwendet werden.

Die qRT-PCR hat den Vorzug, dass innerhalb von kurzer Zeit mit weniger Arbeitsaufwand und ohne Strahlenbelastung die mRNA detektiert werden kann. Zudem kann eine genaue Quantifizierung der vorhandenen mRNA innerhalb der exponentiellen Phase der qRT-PCR durch relativen Vergleich des mRNA-Gehalts durchgeführt werden (Comparative  $\Delta C_T$ -Method). Bei dem RPA dagegen beruht die Messung der RNA-Menge auf der Intensitätsmessung der RNA-Banden, die auf dem Film durch Schwärzung entstehen. Die Intensität der RNA-Banden ist aber nicht nur von der RNA-Menge abhängig, sondern auch von Belichtungszeit des Filmes. Nach einer gewissen Zeit kann es somit zu einer Sättigung des Signals kommen, sodass möglicherweise kleinere Unterschiede im RNA-Expressionslevel nicht mehr detektiert bzw. bei Übersättigung nicht mehr aufgelöst werden können.

Die RPA war aber für die Feststellung der Unterschiede in der RNA-Expression für diese Arbeit vollkommen ausreichend, denn ausschlaggebend war der messbare Unterschied in der Proteinexpression der MT-MMPs.

### **6.2.2 Western Blot für die humanen MT-MMPs**

Im Western-Blot konnte die Expression von MT1-, MT3-, MT4- und MT6-MMP auf Proteinebene in den hMT-MMP transduzierten Astrozyten bestätigt werden. Neben der



inaktiven und aktiven Form des MT1-MMP war noch eine dritte Bande auf Höhe von 50 kDa zu sehen, die deaktiviertes MT1-MMP oder eine kleinere aktive MT1-MMP-Form sein könnte. Im Gegensatz zum MT3- und MT6-MMP Western-Blot, bei denen die MIGR-II-Proben keine Banden zeigten, waren die Proteine des MT1- und MT4-MMP auch bei den MIGR-II transduzierten Astrozyten zu sehen. Im Fall von MT1-MMP liegt dies an der konstitutiven Expression des MT1-MMP in murinen Astrozyten, welches ebenfalls vom verwendeten Antikörper erkannt wird, da dieser eine Speziesselektivität für humanes und murines MT1-MMP aufwies. Das Auftreten der MT4-MMP Bande in den MIGR-II-Lysaten ist mit einer konstitutiven Expression nicht erklärbar, da in der RPA kein Signal für MT4-MMP gesehen wurde. Möglicherweise liegt hier eine (teilweise) Kreuzreaktivität des Antikörpers mit einem anderen Protein vor.

MT2- und MT5-MMP konnten im Western-Blot nicht nachgewiesen werden. In allen Western-Blots für MT2- und MT5-MMP waren bei MIGR-II- und hMT-MMP-Proben gleiche Proteinbandenmuster ohne spezifische Bande bei der MT2- oder MT5-MMP-Probe zu erkennen, obwohl im RPA konstitutiv keine Expression der murinen Gene nachweisbar war. Diesem könnte eine unzureichende Spezifität der Antikörper, eine Kreuzreaktivität der Antikörper mit anderen MT-MMPs oder MMPs oder aber einfach eine zu geringe Menge von MT2- bzw. MT5 MMP in den Lysaten zugrunde liegen. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass das humane MT2- bzw. MT5-MMP in den murinen Zellen nicht korrekt im endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat prozessiert wird und somit gar nicht an die Zelloberfläche gelangt. Um dies auszuschließen, wären zusätzlich eine Immunopräzipitation oder eine Membranfraktionierung erforderlich gewesen. Mit Hilfe dieser beiden Methoden konnte die Anwesenheit von MT2- als auch von MT5-MMP von verschiedenen Forschungsgruppen bereits evaluiert werden [116, 149, 174, 176].

### **6.2.3 Immunzytochemie für die humanen MT-MMPs**

Mit der Immunzytochemie wurden die hMT-MMPs auf der Oberfläche oder im Zytosol der Astrozyten der Zellreihe A1 dargestellt. Die Immunfluoreszenzsignale der hMT1-6-MMP exprimierenden Astrozyten war wesentlich stärker als die der MIGR-II transduzierten Astrozyten. Die in der Immunzytochemie dargestellten hMT-MMPs

waren sowohl in der Zellmembran und als auch im Zytosol der Astrozyten zu finden. Durch die vorherige Methanol/Aceton-Fixation wurden die Astrozyten permeabilisiert, sodass nicht nur die in der Zellmembran befindlichen, sondern auch die im Zytosol befindlichen Proteine durch den Primärantikörper detektiert wurden. Eigentlich sind MT-MMPs in der Zellmembran verankerte Proteine. Da aber z.B. das MT1-MMP Clathrin-abhängig oder unabhängig endozytiert und in die Zelle internalisiert wird, kann es auch dort nachgewiesen werden [125]. Endozytiertes MT1-MMP wird an der Stelle in die Zellmembran eingebaut, an der es für die Migration der Zelle benötigt wird. Zudem konnte eine nukleäre Lokalisation von MT1-MMP von Ip et al. und Yang et al. gezeigt werden [61, 170]. Somit konnte in dieser Untersuchung die gesamte Menge der MT-MMP in den Astrozyten erfasst werden.

#### 6.2.4 Gelatin-Zymographie

Anhand der Gelatin-Zymographie sollte ein indirekter Nachweis der Aktivität der hMT-MMP erfolgen, da diese proMMP-2 aktivieren können [83, 99, 132, 139, 145, 175]. Zusätzlich wurden aber auch MT4- und MT6-MMP untersucht, um die widersprüchlichen Angaben in der Literatur, die sowohl eine proMMP-2 Aktivierung als auch keine proMMP-2 Aktivierung sahen, zu überprüfen [32, 140, 160, 164].

Im Gegensatz zur erwarteten verstärkten Aktivierung von MMP-2 in den Zellkulturüberständen hMT-MMP transduzierter Astrozyten, zeigte die Auswertung der mittleren Intensität der gelatinolytisch entstandenen Banden des murinen MMP-2 keine Unterschiede zwischen den MT-MMP- und den MIGR-II transduzierten Astrozyten.

Es stellte sich heraus, dass im Gegensatz zu den Kulturüberständen zahlreicher Gliomzelllinien [38, 56, 92, 151] MMP-2 in den Überständen muriner Tp53<sup>-/-</sup>-Astrozyten bereits konstitutiv nahezu vollständig aktiviert vorliegt. Dies spricht neben der hohen Expression des TIMP-1 für den aktivierten Status der Astrozyten. Dadurch wäre es möglich, dass MMP-2 bereits maximal aktiviert war, sodass die exprimierten hMT-MMPs kein zusätzliches proMMP-2 mehr aktivieren konnten.

Um zu beurteilen, ob das Problem möglicherweise darin bestand, dass die humanen MT-MMP das murine proMMP-2 nicht aktivieren können, wurde noch ein weiterer Ansatz mit den Überständen der U87-Glioblastomzellen verfolgt. In der Literatur ist zwar schon beschrieben, dass eine derartige Aktivierung prinzipiell möglich ist. So

zeigten Sato et al. 1994 in murinen Fibroblasten, dass humanes MT1-MMP murines MMP-2 aktivieren kann [132]. Dies sollte aber nochmals überprüft werden. Daher wurde der Überstand von humanen U87-Glioblastomzellen, die sehr viel humanes proMMP-2 sezernieren [86], auf die murinen MT-MMP transduzierten Astrozyten gegeben. Auch hier zeigte sich kein Unterschied zwischen den MIGR-II und hMT-MMP transduzierten Astrozyten. Die stärkere Bande des aktiven MMP-2 auf Höhe von 64 kDa, die sich nur bei den transduzierten Astrozyten in dieser hohen Intensität darstellte, könnte durch die Aktivierung des humanen MMP-2 durch die murinen Astrozyten entstanden sein.

Ob die hMT-MMP aber das murine MMP-2 aktivieren können, konnte in diesen Untersuchungen nicht festgestellt werden.

#### **6.2.5 Peptid-Substratassay mit fluorogenen Substraten**

Da die hMT-MMP-Aktivität mit der Gelatine-Zymographie daher nicht nachweisbar war, sollte die Aktivität mit verschiedenen Fluoreszenz-Substraten nachgewiesen werden, die von den verschiedenen MT-MMPs unterschiedlich stark gespalten werden. Das fluorogene Substrat wird von der Proteasedomäne der MT-MMPs, gespalten, wobei es zur Fluoreszenzemission kommt. Diese Fluoreszenzzunahme wurde photometrisch über einen Zeitraum von 120 Min. gemessen. Hierfür wurden die Substrate PEPDab005, PEPDab008 und das MT1-MMP-Substrat verwendet [31-32, 100].

Es konnte im Vergleich zu dem Lysat der MIGR-II transduzierten Astrozyten keine erhöhte proteolytische Aktivität durch das Lysat der MT1- und MT4-MMP transduzierten Astrozyten festgestellt werden. Die Zunahme der Fluoreszenz, also die proteolytische Aktivität, in den Lysaten der MIGR-II transduzierten Astrozyten war konstitutiv schon so hoch, dass ein Unterschied zu den MT-MMP transduzierten Astrozyten nur schwer nachweisbar gewesen wäre. Diese konstitutiv hohe Aktivität der Kontrollastrozyten war schon bei der Gelatine-Zymographie gesehen worden. Trotzdem wäre bei der hohen Sensivität des Assays eigentlich auch die Detektion kleiner Unterschiede zu erwarten, sodass es noch nicht identifizierte Störfaktoren geben muss, die auch diese kleinen Unterschiede überlagerten.

Ein Nachweis der Aktivität war daher mit dieser Methode nicht zu erbringen, obwohl

für das MT1-MMP-Substrat sowie das PEPDab005 (TNF- $\alpha$ ) und PEPDab008 (ProCha) in der Literatur schon Ergebnisse vorliegen [31, 100]. Diese Ergebnisse basieren jedoch nicht auf der Verwendung von Membranpräparationen, sondern auf der Messung der einzelnen Enzyme [31]. Im Gegensatz dazu ist bei der Membranpräparation zu berücksichtigen, dass nicht nur die Aktivität von einem Enzym gemessen wird, sondern von allen Enzymen in der Membran. Zudem könnte eine unsaubere Membranpräparation zu einem Vorkommen von zytosolischen Proteinen wie MMP-2 im Lysat geführt haben [101], sodass dadurch der Effekt der MT-MMP möglicherweise zusätzlich überlagert wurde.

Wie von Moss et al. und English et al. beschrieben, werden die hier verwendeten Substrate außerdem nicht nur durch MT1- und MT4-MMP, sondern durch eine Reihe weiterer MMP abgebaut [31, 100]. Hierzu zählt auch MMP-2, welches in der Gelatin-Zymographie eine hohe Aktivität zeigte. Dieses MMP-2 wird zwar normalerweise sezerniert, aber im Aktivierungsprozess ist es in einem MT1-MMP-TIMP-2-MMP-2-Komplex an die Zellmembran gebunden. Hierdurch könnte in der Zellmembran gebundenes, aktiviertes MMP-2 die Ergebnisse beeinflusst haben.

Eine genauere Präparation der Membranen z. B. durch Ultrazentrifugation oder durch Filterung der MT-MMP-Proteine aus den Membranpräparationen könnte zu besseren Ergebnissen führen.

### **6.3 Einfluss der humanen MT-MMP auf die Migrationsfähigkeit von murinen Astrozyten**

Um die Migrationsfähigkeit der Astrozyten zu überprüfen, wurden die in Kap. 5.8 beschriebenen Methoden *Scratch*-Assay, Matrigel-Invasions-Assay und OPoSSM-Assay durchgeführt.

#### **6.3.1 *Scratch*-Assay**

Wie bereits dargestellt, diene der *Scratch*-Assay dem direkten Nachweis der Migrationsfähigkeit der Astrozyten. Es konnte nachgewiesen werden, dass alle hMT-MMP exprimierenden Astrozyten auf einer zweidimensionalen Kulturschale eine

signifikant höhere Migrationsfähigkeit zeigten als die MIGR-II transduzierten Astrozyten.

In vitro wurde somit ein Nachweis über das pro-migratorische Potential der hMT-MMP erbracht. Eine Aussage über die Migrationsfähigkeit der MT-MMP transduzierten Astrozyten im ZNS lässt sich an dieser Stelle noch nicht treffen. Interessanterweise zeigten auch die nur mit dem Kontrollvektor transduzierten Zellen ein migratorisches Potential. Dies könnte aus der hohen Aktivität des MMP-2 resultieren, sodass die Tp53<sup>-/-</sup>-Astrozyten konstitutiv migratorisch aktiv sind. Zum anderen ist die Migration Ausdruck der physiologischen Funktionen von Astrozyten, sich untereinander zu verknüpfen und Netzwerke zu bilden [63, 133].

### 6.3.2 Matrigel-Invasionsassay

Im Anschluss wurde der Matrigel-Invasions-Assay durchgeführt. Dieser Assay untersucht im Gegensatz zum *Scratch*-Assay nicht nur die Migration, sondern auch die Invasion von Zellen. Da in diesem Assay mit einer künstlichen Matrix aus Bestandteilen der Basalmembran, von murinen Sarkomzellen, gearbeitet wird und die Zellen in drei Dimensionen durch die Matrix wandern können, ist dieser Assay naturgetreuer als der *Scratch*-Assay.

Bei der Durchführung des Assays zeigte sich, dass die Astrozyten im Gegensatz zu U87-Glioblastomzellen nicht bis zur Unterseite der Membran migrierten. Dies könnte zum einen daran liegen, dass die Astrozyten untereinander verbunden auf der Oberfläche der Matrigel-Matrix adhärirten. Zum anderen starben die Tp53<sup>-/-</sup>-Astrozyten auf der Membran ab oder bildeten Sphären und wanderten nicht durch die Membran hindurch.

Ob die Astrozyten in die Matrigel-Matrix invadierten, wurde nicht abschließend untersucht. Bernstein et al. konnten aber für fetale Astrozyten schon nachweisen, dass diese nicht in Matrigel einwandern [8]. So verhalten sich die hier verwendeten Tp53<sup>-/-</sup>-Astrozyten wie fetale Astrozyten ohne Zeichen einer Transformation.

Die zusätzlich untersuchten U87-Glioblastomzellen dagegen konnten sowohl durch die Matrigel-Matrix als auch durch die Membran wandern, sodass der Matrigel-Invasions-Assay für diesen Zelltyp in unseren Händen durchaus funktioniert. Der Grund für die mangelnde Migration über die Membran bzw. in die Matrigel-Matrix könnte ein

Hinweis darauf sein, dass den Tp53<sup>-/-</sup>-Astrozyten wie den fetalen Astrozyten bestimmte Faktoren fehlen, die den U87-Glioblastomzellen eine Penetration der Matrigel-Matrix und ein Überleben auf der Membran ermöglichen.

So konnte mit diesem Assay die Invasionsfähigkeit der Astrozyten nicht beurteilt werden. Warum sich die Tp53<sup>-/-</sup>-Astrozyten auf der Membran sowie der Matrigel-Matrix so verhalten, wurde nicht weiter untersucht und bleibt für den Moment ungeklärt. In dieser Arbeit konnte aber festgestellt werden, dass der Zelltyp des neonatalen murinen Tp53 defizienten Astrozyten nicht mit dem Matrigel-Invasions-Assay untersucht werden kann.

### **6.3.3 Der neue OPoSSM-Assay**

#### 6.3.3.1 Das Modell

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, eine neue Methode zu etablieren, die es ermöglicht, Astrozyten in ZNS-typischem Gewebe zu untersuchen. Als Vorbild hierfür dienten Arbeiten von Campenot et al. und Belien et al. [6, 15]. Für den neuen OPoSSM-Assay wurde erstmals Rückenmark vom Schwein genutzt, welches sich zur Präparation von 300 µm dicken Rückenmarksschnitten als besonders geeignet erwies.

Die Gene des Schweines weisen zudem hohe Homologien zu den Genen des Menschen auf [37], sodass mit dem OPoSSM-Assay ein physiologisches, dem ZNS des Menschen ähnliches Modell etabliert wurde.

Vorteile der Rückenmarksschnitte waren:

1. die Sicherheit, dass vergleichbare Nervenbahnen zur Wanderung vorhanden waren
2. die Modifizierbarkeit, d.h. die Möglichkeit, die Länge der Schnitte besser bestimmen zu können
3. die Vergleichbarkeit zwischen mehreren Schnitten
4. die nahezu unbegrenzte Verfügbarkeit von Schweine-Rückenmark sowie
5. die Einsparung von Versuchstieren.

Im Hinblick auf die Methodik erwies sich die Präparation der Rückenmarksschnitte vom Schwein als wesentlich einfacher zu handhaben als in Versuchen von Belien et al., die MT1-MMP transduzierte Fibroblasten und C6-Glioblastomzellen in den Nervus opticus von Ratten einwandern ließen [6]. Zudem war es aufgrund der Dicke der

Rückenmarksschnitte im Vergleich zu den Präparaten des optischen Nerves in der Arbeit von Belien et al. möglich, das dreidimensionale Eindringen der Astrozyten in den Rückenmarksschnitt zu zeigen. Weiterhin ist das eingefrorene Rückenmark jederzeit für Versuche verfügbar. Rezeptoren, die die Tumorzellen zur Wanderung nutzen, dürften durch das Einfrieren erhalten bleiben. Die Ausschüttung von Botenstoffen aus dem toten Rückenmark ist dagegen nicht mehr gegeben.

Die Möglichkeit, eine große Anzahl von Versuchen durchzuführen, ist besonders vorteilhaft, da dadurch auch die Darstellung geringer Unterschiede des Migrationsverhaltens zwischen verschiedenen Zellen möglich ist.

Mit der Wiederholung der Versuche wurden zudem Fehler wie eine ungenaue Zellkettenauszählung, leichte Unregelmäßigkeiten in den Rückenmarksschnitten, die unterschiedliche Applikation des Agars auf den Rückenmarksschnitt und der Astrozyten vor den Rückenmarksschnitt ausgeglichen.

Da die Astrozyten trotz Eigenfluoreszenz durch das GFP in den Rückenmarksschnitten nicht gut zu sehen waren, wurde zur Verstärkung des Signals eine immunzytochemische Fluoreszenzfärbung gegen GFP durchgeführt. Durch diese Fluoreszenzfärbung waren alle Astrozytenketten sehr gut sichtbar. Da letztendlich nicht die einzelnen Astrozyten, sondern die Astrozytenketten ausgezählt wurden, konnte auf eine Kernfärbung verzichtet werden.

Zu den vor allem versuchstechnischen Vorteilen ist hinzuzufügen, dass die schnelle und kostengünstige Durchführbarkeit ein besonderer Vorteil des OPoSSM-Assay ist. So können mit einer Versuchsreihe innerhalb von zwei Wochen je nach Kapazität die Wanderung von Zellen in eine hohe Anzahl von Rückenmarksschnitten untersucht werden. Das Material für die Versuche ist überall verfügbar, wodurch die hohen Kosten für das Halten von Versuchstieren sowie für künstliche Migrationsassays entfallen. Dies bedeutet, dass der OPoSSM-Assay nicht nur ein physiologisch adäquates Modell zur Untersuchung des Migrationsverhaltens von Zellen ist, sondern dass zudem mit geringen Kosten und wenig Zeitaufwand eine hohe Anzahl von Ergebnissen erzielt werden kann.

In Zukunft könnte also die Verwendung von Bestandteilen von Tieren, die sowieso der Schlachtung zugeführt werden, eine Möglichkeit sein, Kosten zu sparen und den Versuchsaufwand zu reduzieren. Im gleichen Schritt wird die Anzahl von Versuchstieren

reduziert und somit auch zum Tierschutz beigetragen.

### 6.3.3.2 Ergebnisse des OPoSSM-Assay

Für die statistische Auswertung des OPoSSM-Assay wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse, ANOVA (*Analysis of variance*) durchgeführt. Dieses Verfahren wurde verwendet, obwohl die Migrationsdaten nicht normalverteilt waren, da es kein nichtparametrisches Pendant gab. Dass die Werte nicht einer Normalverteilung entsprechen, kann an den Einflussfaktoren auf die Methodik des OPoSSM-Assay liegen. Faktoren wie Rückenmarksschnittunterschiede und der Applikation der Astrozyten und des Agars spielen dabei eine Rolle.

Im neuen OPoSSM-Assay konnte, wie im *Scratch*-Assay, nachgewiesen werden, dass alle hMT-MMP transduzierten Astrozyten stärker migrierten als die mit Kontrollvektor transduzierten Astrozyten. Die Varianzanalyse zeigte, dass bei MT1-MMP, MT4- und MT6-MMP dieser Unterschied in der Migration gegenüber den mit Kontrollvektor transduzierten Astrozyten statistisch signifikant war. Der Einfluss von MT1-MMP auf die Migration der Astrozyten war insbesondere durch eine Erhöhung der Kettenanzahl in den ersten beiden Millimetern des Rückenmarkschnittes zu sehen. MT4- und MT6-MMP dagegen führten zu einer positiven Verstärkung der beiden Parameter Kettenanzahl und Infiltrationstiefe. Interessanterweise bilden gerade MT4- und MT6-MMP, die im OPoSSM-Assay die Migration am meisten erhöhten, aufgrund ihrer Verankerung über einen GPI (Glykosylphosphatidylinositol)-Anker in der Zellmembran eine eigene Gruppe innerhalb der MT-MMPs.

Durch diese GPI-Verankerung sind MT4- und MT6-MMP in *lipid rafts* integriert [140], was die Signaltransduktion, die Endozytose und die Lokalisation innerhalb einer Zelle beeinflussen kann [114, 128, 144]. Vor allem der Einbau der GPI-Proteine in *lipid rafts* an der apikalen Oberfläche der Zelle fördert die Migration von Zellen [114]. Dies könnte dazu geführt haben, dass MT4- und MT6-MMP an der migrierenden apikalen Zellseite der Astrozyten in die Zellmembran eingebaut wurden, wodurch der Effekt auf die Migration wesentlich größer als bei den anderen MT-MMPs war.

Andererseits aktivieren beide die ADAMTS4, welches unter anderem das ZNS-spezifische Brevican abbauen kann [91]. Dadurch fördert die ADAMTS4 das invasive



Wachstum von 9L Gliom-Sarkom Rattenzellen in das Gehirn sowie die Progression von Astrozytomen [39, 52, 91, 140].

Auf welche Art und Weise die hMT-MMPs Einfluss auf die Migration der Astrozyten genommen haben, wurde in dieser Arbeit nicht explizit untersucht. Um den genauen Effekt der hMT-MMPs zu erfassen, sind daher noch weitere Untersuchungen nötig. Hierbei sollten die Substrate im Rückenmarksschnitt identifiziert werden, über deren Abbau die hMT-MMPs die Migration der Astrozyten fördern könnten. Es ist anzunehmen, dass die hMT-MMPs Bestandteile der Basallamina und der Extrazellulärmatrix des ZNS proteolytisch gespalten haben, um den Astrozyten die Migration an den Gefäßen zu ermöglichen. Mögliche Substrate in der Basallamina und der EZM für MT1-MMP sind Kollagen 1, 2 und 4, Nidogen, Perlecan und Laminin, für MT2-MMP Nidogen, Laminin, Perlecan und Tenascin, für MT5-MMP Dermatan- und Chondroitinsulfat und Cadherine sowie für MT6-MMP wiederum Dermatan- und Chondroitinsulfat, Kollagen 4 und Laminin. Indirekt könnten MT4- und MT6-MMP über die Aktivierung der auch in Astrozyten exprimierten ADAMTS4 (*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*) [39, 49, 140], MT1-MMP über die Aktivierung des proMMP-13 [53, 71] und MT5-MMP über die Aktivierung des proMMP-9 die Migration fördern [83, 116], da diese Proteine alle einen migrationsfördernden Effekt gezeigt haben. Für MT3-MMP sind bislang weder Substrate der Basallamina noch des EZM des ZNS in seinem Substratprofil bekannt.

#### **6.4 Die Organisation von Astrozyten in ZNS-typischem Gewebe**

In dieser Arbeit konnte anhand verschiedener Methoden gezeigt werden, dass die das Schweine-Rückenmark invadierenden Astrozyten sich untereinander verbindend Netzwerke ausbilden. Eine Verknüpfung von Astrozyten zu Netzwerken untereinander konnte von Scheef et al. in Matrigel-Matrix schon nachgewiesen werden [133]. Im Gegensatz hierzu verbanden sich die Astrozyten im Rückenmark untereinander zu langen Ketten und bildeten daraus ein dreidimensionales Netzwerk. Dieses Netzwerk war bei den hMT-MMP transduzierten Astrozyten, bei den mit Kontrollvektor transduzierten Astrozyten und den U87-Glioblastomzellen zu sehen. Mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie konnten die netzartigen Strukturen in mehreren Ebenen des Rückenmarksschnittes dargestellt und nachvollzogen werden.

Diese Netzwerke bildeten sich, wie anhand der Semidünnschnitte gezeigt wurde, an der Basallamina von bestehenden Gefäßen des Rückenmarks aus. Die Wanderung der Astrozyten an der Basallamina der Gefäße wird unter physiologischen Bedingungen dadurch ermöglicht, dass die Astrozyten mit ihren in der Zellmembran enthaltenen Rezeptoren wie Integrin und Dystroglykan an Bestandteile der Basalmembran wie Laminin, Perlecan, Kollagen IV und Fibronectin binden [126].

Unter hypoxischen Bedingungen, wie sie im Rückenmark vorlagen, werden diese Bestandteile der Basalmembran abgebaut. Bei dem Abbau von Perlecan entsteht die Perlecan-Domäne V, die neuroprotektive Eigenschaften hat [79, 126]. Diese Domäne führt zur einer verstärkten Dystroglykan Expression in perivaskulär gelegenen Astrozyten, sodass diese stärker an den Gefäßen adhäreren und diese damit schützen [2, 79]. Zudem exprimieren die Endothelzellen unter Hypoxie vermehrt  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin und Fibronectin, um durch Fibronectin ihre eigene Proliferation über das in ihren Zellmembranen verankerte  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin zu stimulieren [96]. Auch Astrozyten enthalten in ihrer Zellmembran  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin [95], sodass sie an dieses exprimierte Fibronectin binden können.

Die Beobachtung, dass Astrozyten an der Basallamina von Gefäßen entlangwandern, wird zudem durch Untersuchungen von Emmett et al. gestützt. Sie zeigten, dass bei der Implantation von Astrozyten in das Gehirn von Ratten diese an den Gefäßen zwischen dem perivaskulären Kollagen und dem Myelin der weißen Substanz wanderten [28-29]. Im Gegensatz zu der Studie von Emmett et al., in der die Astrozyten einzeln wanderten, blieben die Astrozyten in dieser Arbeit untereinander in Kontakt und bildeten kettenförmige Netzwerke. Diese Netzwerke ähneln sehr stark den von Endothelzellen gebildeten Gefäßnetzen, die Itoh et al. in Matrigel-Matrix zeigen konnten [63]. An diese Gefäßnetze lagerten sich in deren Studie die Astrozyten zur Aufrechterhaltung der Gefäße an. Zusätzlich zu der Aufrechterhaltung der Vaskularisierung sind Astrozyten außerdem in der Lage, die Vaskularisierung erst zu ermöglichen [82].

Das bedeutet, dass die hier verwendeten  $Tp53^{-/-}$ -Astrozyten gemäß ihrer physiologischen Funktion, die Vaskularisierung innerhalb des ZNS aufrechtzuerhalten, sich an der Basallamina der Gefäße anlagerten. Damit zeigen sie, wie schon bei den Versuchen mit der Matrigel-Matrix, ein den fetalen Astrozyten typisches Verhalten. Die Verknüpfung der Astrozyten untereinander zu Ketten spricht zudem gegen das

transformationstypische Zeichen einer Kontaktinhibition.

Die Astrozytomzellen können dagegen einzeln oder innerhalb einer Zellgruppe nicht nur entlang von Gefäßen, sondern auch diffus in das umliegende Gewebe infiltrieren, wobei die Migration durch normale Zellen wie Fibroblasten gehemmt und durch maligne Zellen gefördert wird [40-42, 66].

## 6.5 Abschließende Bewertung und Ausblick

Wie in der Einleitung beschrieben wurde, gibt es viele Anhaltspunkte für eine Beteiligung der MT-MMP bei der Progression von Astrozytomen. Alle MT-MMPs werden in Astrozytomen exprimiert bzw. überexprimiert [104, 106] und besitzen zudem Invasivitäts- und Migrations-fördernde Eigenschaften. Belien et al. wiesen nach, dass MT1-MMP transduzierte Fibroblasten im Gegensatz zu Wildtyp-Fibroblasten in den Nervus opticus von Ratten einwandern [6]. In einer Studie von Markovic et al. förderte MT1-MMP in Mikroglia die Wanderung von GL261-Gliomzellen in organotypische Schnitte [88].

Das Ziel dieser Doktorarbeit war es, den Einfluss der humanen MT-MMP auf die Astrozytenmigration in ZNS-typischem Gewebe zu untersuchen und damit eine mögliche Bedeutung für die Astrozytomprogression nachzuweisen. Zu diesem Zweck war eine ausreichende Expression der humanen MT-MMP in den Astrozyten erforderlich, die sowohl auf RNA- als auch auf Proteineebene darstellbar war. Die Aktivität der humanen MT-MMP war dagegen mit der Gelatin-Zymographie und dem Peptid-Substratassay mit fluorogenen Substraten nicht nachweisbar. Zurzeit gibt es noch keine etablierte Methodik, um die Aktivität der MT-MMP in reaktiven Astrozyten mit vollständig aktiviertem MMP-2 nachzuweisen. Die signifikanten Ergebnisse des *Scratch*- und OPoSSM-Assays sprechen dafür, dass die humanen MT-MMPs ihre Funktion ausüben konnten.

Die humanen MT-MMPs zeigten folglich in zwei verschiedenen *in vitro*-Methoden, dem *Scratch*- und OPoSSM-Assay, ihren positiven Einfluss auf die Migration der Astrozyten. Dieser Einfluss könnte zum einen auf die direkte Wirkung der MT-MMP auf die Substrate der Basallamina und des EZM oder auf die indirekte Wirkung durch die Aktivierung des proMMP-9 bzw. proMMP-13 oder der ADAMTS4 zurückzuführen sein [6]. Eine Erklärung für die besonders starken Effekte von MT4- und MT6-MMP im

OPoSSM-Assay stellt die Aktivierung der ADAMTS4 dar.

Der neu etablierte OPoSSM-Assay stellte sich als eine besonders geeignete Methode heraus, um die Migrationsfähigkeit und das Wanderungsverhalten der Astrozyten zu beobachten. Denn der OPoSSM-Assay ist im Vergleich zu bisherigen Modellen [6, 15] tierschützend, kostengünstig, effektiv und schnell durchführbar. Durch die weitere Etablierung dieser Methode könnte ein standardisiertes Verfahren entwickelt werden.

Zurzeit ist dieser Assay außerdem eine der wenigen Möglichkeiten, Astrozyten auf ihre Migrationsfähigkeit zu untersuchen, da die Invasionsfähigkeit sowohl fetaler [8] als auch neonataler Tp53 defizienter Astrozyten nicht mit dem Matrigel-Invasions-Assay untersucht werden kann. Dies wurde in dieser Arbeit für neonatale Tp53<sup>-/-</sup>-Astrozyten gezeigt.

In Bezug auf das Wanderungsverhalten verhielten sich die Tp53<sup>-/-</sup>-Astrozyten wie murine fetale Astrozyten und unterschieden sich deutlich von Astrozytomzellen. Dies bedeutet, dass die positiven Ergebnisse der Migrationsassays sich vorerst nur auf murine Astrozyten beziehen und noch keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob MT-MMPs eine ähnliche Wirkung auf Astrozytomzellen haben. Aufgrund der Expression der MT-MMPs in Astrozytomen und der positiven Effekte auf die Migrationsfähigkeit der Tp53<sup>-/-</sup>-Astrozyten ist dies aber anzunehmen.

In weiteren Versuchen muss also der fördernde Effekt der humanen MT-MMPs auf die Migrationsfähigkeit von Astrozytomzellen *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen und von Astrozyten *in vivo* bestätigt werden. Für den *in vivo* Nachweis könnten Astrozyten oder Astrozytomzellen mit hMT-MMP-Überexpression stereotakisch in die Gehirne von Mäusen implantiert werden. Zudem wäre eine spezifische Hemmung der MT-MMPs durch Antikörper oder die Hemmung der MT-MMP-Synthese durch siRNA eine weitere Option, um zu bestätigen, dass der pro-migratorische Effekt auf die MT-MMPs zurückzuführen ist [25].

Wenn diese Versuche die pro-migratorische Rolle der MT-MMP untermauern, könnten innovative therapeutische Ansätze entwickelt und damit die Prognose bei Astrozytomentpatienten verbessert werden.

## 7. Anhang

### 7.1 Oligonukleotide

#### 7.1.1 Vektorherstellung:

Migr-Deluxe-2 F:

5'-GATCGAATTCGAACTCGAGGTTTAAACGCGGCCGCGGATCCGTTAAC-3'

(Biomers, West Ulm/Donau)

Migr- Deluxe-2 R:

5'-AATTGTTAACGGATCCGCGGCCGCGTTTAAACCTCGAGTTCGAATTC-3'

(Biomers, West Ulm/Donau )

#### 7.1.2 Sequenzierung:

MT-MMP`s im Grundvektor:

T7-prom: gestellt von Agowa, Berlin

SV40pA-R: 5'-GAAATTTGTGATGCTATTTTC-3' (Biomers)

MT-MMP`s im MIGR-1 bzw. MIGR-Deluxe-2:

MSCV-5-Primer: 5'-CCCTTGAACCTCGTTTCGACC-3' (Biomers)

Migr2-Seq-3-Primer: 5'-ACATATAGACAAACGCACACCGG-3' (Biomers)

### 7.2 Verbrauchsmaterialien

<sup>32</sup> P-UTP	PerkinElmer, Waltham	Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
0,05% Trypsin/EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis	Albumin bovine serum	Sigma-Aldrich, St. Louis
5x Transkriptionspuffer	Promega, Madison	Ammoniumpersulfate-	Pharmacia-Biotech,
10x DNase Puffer	Promega, Madison	Plus-One	Uppsala
25x TAE	Calbiochem, Novabiochem, Bad Soden	Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
		Ampicillin	Roth, Karlsruhe
		Aqua injectabile	Braun, Melsungen

Borsäure	Fisher Scientific, Leicestershire	HBSS	Gibco, Eggenstein
Brij-35	Merck, Darmstadt	HEPES	Invitrogen, Karlsruhe
Brilliant Blue R	Sigma-Aldrich, St. Louis	Hydrogen peroxide	Acros Organics, New Jersey
Bromphtenol-Blau	Sigma-Aldrich, St. Louis	Immobilon Transfer Membranes	Millipore, Billerica
BSA	Sigma-Aldrich, St. Louis	Isofluran	Baxter, Unterschleißheim
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt	Isopropanol	Sigma-Aldrich, St. Louis
Chloroform	Merck, Darmstadt	LB-Medium	Roth, Karlsruhe
Complete	Roche, Basel	Luminol	Fluka (Sigma-Aldrich), St. Louis
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis	Luria Broth Base	Invitrogen, Paisley
Dinatriumhydrogenphosphat- Dihydrat	Roth, Karlsruhe	Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
DMEM + Glutamax	Gibco, Eggenstein	Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
dNTPS	Abgene, Cambridge	Magermilchpulver	Appli-Chem, Gatersleben
DPBS	Gibco, Eggenstein	Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
DTT	Promega, Madison	Methanol	Sigma-Aldrich, St. Louis
EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis	Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe	Natriumazid	Sigma-Aldrich, St. Louis
Ethidiumbromid	Amersham Biosciences, Uppsala	Natriumchlorid	Fluka, Steinheim
Essigsäure	AppliChem, Gatersleben	Natriumcitrat-dihydrat	Merck, Darmstadt
FBS (Fetal Bovine Serum)	PAA, Linz/Pasching	Natrium-Deoxycholat	Applichem, Gatersleben
Fluoromount	Sigma-Aldrich, St. Louis	Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe
Gel-Loading-Buffer	Ambion, Austin	Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Gene-Ruler DNA-Ladder	Fermentas, St. Leon- Rot	N-Butanol	Sigma-Aldrich, St. Louis
Glucose	Gibco, Eggenstein	N-Lauroylsarcosine	Fluka (Sigma-Aldrich), St. Louis
Glutamax	Gibco, Eggenstein	N-N-Dimethylformamide	Sigma-Aldrich, St. Louis
Glutaraldehyde	Roth, Karlsruhe	Nonidet P40	Sigma-Aldrich, St. Louis
Glycerin	Serva, Heidelberg	Osmium Tetroxide	Sigma-Aldrich, St. Louis
Glycin	Roth, Karlsruhe	p-Coumaric Acid	Sigma-Aldrich,
Guanidinthiocyanat	Sigma-Aldrich, St. Louis		

	St. Louis		St. Louis
Pepstatin	Sigma-Aldrich,	Trizol	Invitrogen, Paisley
	St. Louis	tRNA	Roche, Basel
Phenantrolin	Sigma-Aldrich,	Trypsin/EDTA	Gibco, Eggenstein
	München	TWEEN 20 Detergend	EMD4Biosciences,
Phenol	Roth, Karlsruhe		La Jolla
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Eggenstein	Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich,
PIPES	Sigma-Aldrich,		St. Louis
	St. Louis	Whatman-Papier	Whatman, Maidstone
Polybrene	Sigma-Aldrich,	Xylene Cyanole FF	Sigma-Aldrich,
	St. Louis		St. Louis
Prestained Protein Marker	New England Biolabs,	Ziegen-Normalserum	Vector Laboratories,
	Ipswich		Burlingame
Quadriperm Superfrost Plus	Heraeus Instruments,	Zinksulfat	Merck, Darmstadt
	Wehrheim	<u>Enzyme/Kits/Primer:</u>	
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe	DNase I	Roche, Basel
Rotiphorese Sequenziergel	Roth, Karlsruhe	DNase I (RQ1)	Promega, Madison
Verdünner		GoTaqHotStartPolymerase	Promega, Madison
Rotiphorese Sequenziergel	Roth, Karlsruhe	Primer 107	Apara Bioscience,
Konzentrat			Denzlingen
Rotiphorese Sequenziergel	Roth, Karlsruhe	Primer 108	Apara Bioscience,
Puffer			Denzlingen
SDS-Plus-One	Pharmascience Biotech,	Primer 109	Apara Bioscience,
	Uppsala		Denzlingen
Sodium Deoxycholate	Sigma-Aldrich,	Proteinase K	Peqlab, Erlangen
	St. Louis	QIAquick Gel Extraction	Quiagen, Hilden
Sucrose	Sigma-Aldrich,	Kit (50)	
	St. Louis	Qiagen Plasmid Maxi Kit	Quiagen, Hilden
Sulfosalicylicsäure	Sigma-Aldrich,	Restriktionsendonukleasen	Fermentas, Burlington
	St. Louis	RNase A	Roche, Basel
TEMED	Sigma-Aldrich,	RNA Guard	Roche, Basel
	St. Louis	RNase T1	Sigma-Aldrich,
Toluidin	Merck, Darmstadt		St. Louis
Trichloroaceticssäure	Sigma-Aldrich,	Shrimp-Alkaline-	Fermentas, Burlington
	St. Louis	Phosphatase	
Tris	Acros organics,	T4-DNA-Ligase	Promega, Madison
	New Jersey	T7-Polymerase	Promega, Madison
Triton X-100	Sigma-Aldrich,		

## 7.3 Geräte

Absaugsystem Model AC

Centrifuge 5417-R

HLC-Biotech, Bovenden

Eppendorf, Hamburg

Centrifuge 5418	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5810-R	Eppendorf, Hamburg
Digital Graphic Printer MP-D897	Sony, Shinagawa
Easy-Cast Model B	Owl Separation Systems, Portsmouth
EPS 500/400	Pharmacia-LKB, Gaithersburg
Faltenfilter	Roth, Karlsruhe
Feather Disposable Scalpel	Feather Safety Razor Co., Osaka
Fettstift	Science Service, München
Gelapparatur (RPA)	Life-Technologies, Karlsruhe
Gel Casting System 11.14	Biometra, Göttingen
Hamilton	Hamilton Company, Reno
Horizon 11.14	Biometra, Göttingen
IKAMAG Pet-G	IKA, Staufen
Infors HT Aerotron	Infors AG, Bottmingen
Injekt 5 ml	Braun, Melsungen
Intas Chemostar	Intas Science imaging Instruments GmbH, Göttingen
Julabo SW-20C (Wasserbad)	Julabo, Seelbach
Kodak Biomax-S	Kodak Company, Rochester
Kelvitron A	Heraeus Instruments, Wehrheim
Kern 440-47	Kobe, Marburg
Laborfuge AE	Kobe, Marburg
Leica CTR-6000	Leica, Solms
Leica DFC 480	Leica, Solms
Leica DMI 6000B	Leica, Solms
Leica Kübler Codix	Leica, Solms
Leica Kübler Codix ebq100	Leica, Solms
Mc Ilwain Tissue Chopper	H. Laur, Reutlingen
Mikrowelle NN-T221M	Panasonic, Osaka
Mini-Protean	Biorad Laboratories, Hercules
Mode S72-ILST	Olympus, Tokyo
MS2 Minishaker	IKA, Staufen
Multipipette Plus 4780	Eppendorf, Hamburg



Pharmacia EPS KB 600/500	Pharmacia, Stockholm
Pipetboy au	Integra Biosciences, Fernwald
Pipetmen	Gilson, Villiers-le-Bel
PPCO (50 ml, 250 ml)	Nalgene, New York
Power-PAC-300	Biorad, Richmond
Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Rosenthal- Fuchs- Kammer	W. Schreck, Hofheim
Severin FS 3602	Severin, Sundern
Steag-Shicherheitsbank Laminarflow	Steag-Laminarflow-Prozesstechnik, Pfullingen
Steri 250	Keller, Burgdorf
Steri-Cult 200 Incubator	Belotec, Göttingen
SZ2-ILST-Beleuchtungssäule	Olympus, Tokyo
Szintillationszähler	Bromma, Schweden
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	Biometra, Göttingen
Thermocycler	Biorad, München
Transilluminator	Fisher Bioblock Scientific, Leicestershire
Ultrospec 3100 pro	Amersham Biosciences, Uppsala

## 7.4 PSG-5-Vektor

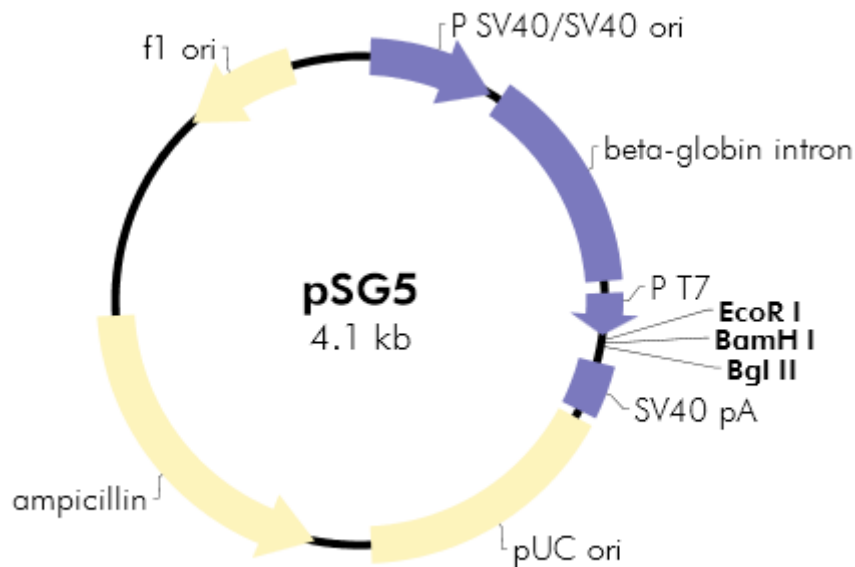
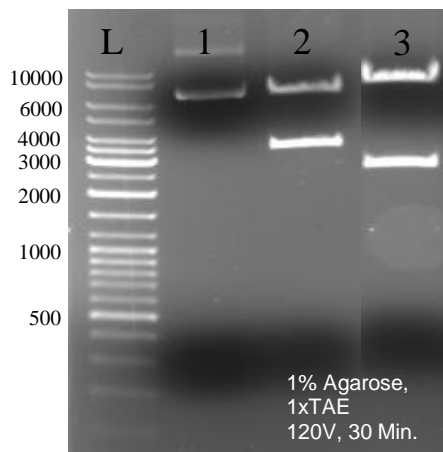


Abb. 7.1: PSG-5-Vektor

## 7.5 Klonierung

### MT1-MMP



### MT2-MMP

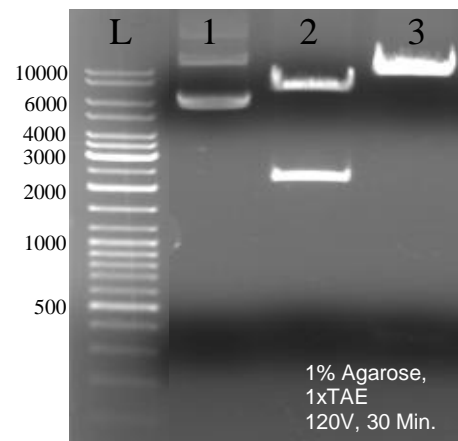


Abb. 7.2: Kontrollverdau des MIGR-I mit *mt1-mmp* und des *mt2-mmp*

L= Größenleiter in Basenpaaren

1= MIGR-I-*mt1-mmp* unverdaut

2= MIGR-I-*mt1-mmp* EcoRI verdaut

3= MIGR-I-*mt1-mmp* BglII verdaut

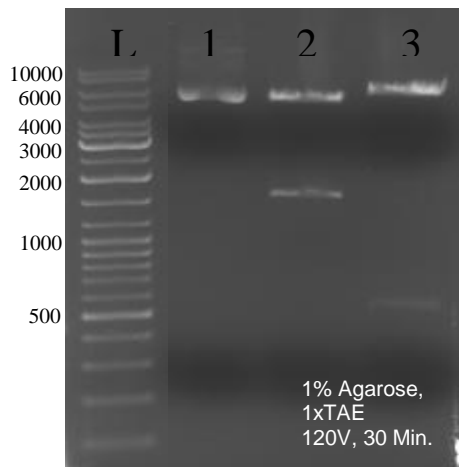
L= Größenleiter in Basenpaaren

1= MIGR-I-*mt2-mmp* unverdaut

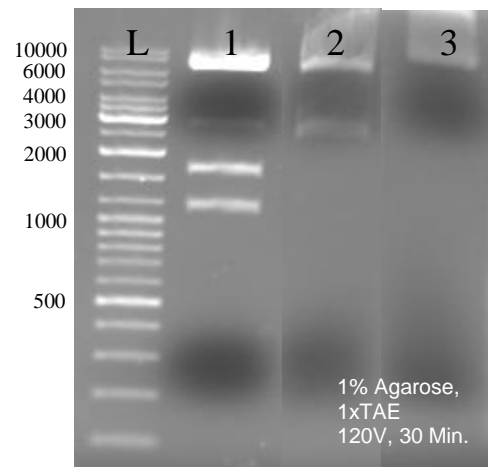
2= MIGR-I-*mt2-mmp* EcoRI verdaut

3= MIGR-I-*mt2-mmp* BglII verdaut

### MT3-MMP



### MT4-MMP



**Abb. 7.3: Kontrollverdau des MIGR-I mit *mt3-mmp* in den und des MIGR-II mit *mt4-mmp***

L= Größenleiter in Basenpaaren

1= MIGR-I-*mt3-mmp* unverdaut

2= MIGR-I-*mt3-mmp* BglII verdaut

3= MIGR-I-*mt3-mmp* EcoRI verdaut

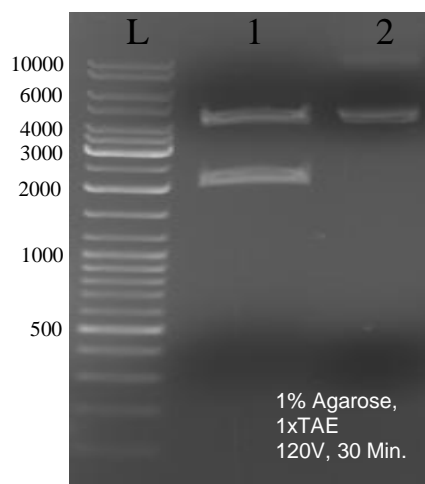
L= Größenleiter in Basenpaaren

1= MIGR-II-*mt4-mmp* HindIII verdaut

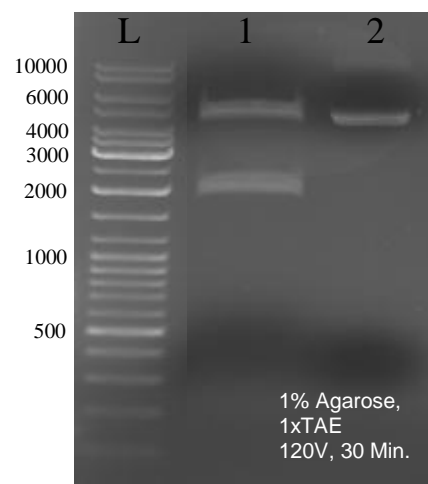
2= MIGR-II-*mt4-mmp* EcoRI/NotI verdaut

3= MIGR-II-*mt4-mmp* unverdaut

### MT5-MMP



### MT6-MMP



**Abb. 7.4: Kontrollverdau des MIGR-II mit *mt5-mmp* und des *mt6-mmp***

L= Größenleiter in Basenpaaren

1= MIGR-II-*mt5-mmp* EcoRI/XhoI verdaut

2= MIGR-II-*mt5-mmp* unverdaut

L= Größenleiter in Basenpaaren

1= MIGR-II-*mt6-mmp* EcoRI/BamHI verdaut

2= MIGR-II-*mt6-mmp* unverdaut

## 7.6 Aufführung einer Auszählung der Rückenmarksschnitte der Zellreihe A3

SCHNITT	M1E	M1M	M1G	M2E	M2M	M2G	M3G	M4G	M5G	GKA
K 1 1 1	2	0	2	1	1	4	0	0	0	6
K 1 1 2	2	0	2	1	2	5	0	0	0	7
K 1 2 1	2	0	2	2	0	2	0	0	0	4
K 1 2 2	1	0	1	3	2	9	0	0	0	10
K 2 1 1	2	3	11	1	2	5	0	0	0	16
K 2 1 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K 2 2 1	6	0	6	4	2	10	7	1	0	16
K 2 2 2	6	1	8	0	0	0	0	0	0	8
K 3 1 1	6	0	6	4	2	10	8	0	0	24
K 3 1 2	6	1	8	0	0	0	0	0	0	8
MT1 1 1 1	4	0	4	0	0	0	0	0	0	4
MT1 1 1 2	4	0	4	0	0	0	0	0	0	4
MT1 1 2 1	3	0	3	2	2	8	4	0	0	15
MT1 1 2 2	3	0	3	3	2	9	0	0	0	12
MT1 2 1 1	0	2	6	8	3	15	3	0	0	24
MT1 2 2 1	3	0	3	0	0	0	0	0	0	3
MT1 2 2 2	2	0	2	0	0	0	0	0	0	2
MT1 3 1 1	0	1	3	4	1	6	1	0	0	10
MT1 3 2 1	2	0	2	1	0	1	0	0	0	3
MT1 3 2 2	2	3	8	2	1	5	0	0	0	13
MT2 1 1 2	0	0	0	1	1	2	0	0	0	3
MT2 1 2 1	4	0	4	2	0	2	0	0	0	6
MT2 1 2 2	2	0	2	2	0	2	0	0	0	4
MT2 2 1 1	3	0	3	2	0	2	0	0	0	5
MT2 2 1 2	2	0	2	0	1	2	0	0	0	4
MT2 2 2 1	8	0	8	1	0	1	0	0	0	9
MT2 2 2 2	4	0	4	1	0	1	0	0	0	5
MT2 3 1 1	7	3	13	6	4	14	0	0	0	30
MT2 3 1 2	12	2	17	5	2	9	0	0	0	26
MT2 3 2 1	17	3	24	0	0	0	0	0	0	24
MT3 1 1 1	4	0	4	3	1	5	3	0	0	12
MT3 1 1 2	3	0	3	2	1	5	5	0	0	13
MT3 1 2 1	2	0	2	3	1	6	4	0	0	12
MT3 1 2 2	2	0	2	1	0	1	1	0	0	4
MT3 2 1 1	1	0	1	3	0	3	0	0	0	4
MT3 2 1 2	2	1	6	1	0	1	0	0	0	7
MT3 2 2 1	2	0	2	12	0	12	0	0	0	14
MT3 2 2 2	2	4	15	7	2	13	2	1	0	31

MT3 3 1 1	3	4	13	0	3	6	9	0	0	28
MT3 3 1 2	3	1	9	6	4	14	6	1	0	30
MT3 3 2 2	2	0	2	0	2	5	7	0	0	14
MT4 1 1 1	3	0	3	1	0	1	0	0	0	4
MT4 1 1 2	2	1	4	1	0	1	0	0	0	5
MT4 1 2 1	1	3	7	3	0	3	0	0	0	10
MT4 1 2 2	1	6	13	2	5	20	3	0	0	36
MT4 2 1 1	4	6	20	0	0	0	0	0	0	20
MT4 2 1 2	4	2	14	7	6	25	5	0	0	44
MT4 2 2 1	5	3	14	2	0	2	0	0	0	16
MT4 2 2 2	4	2	8	0	0	0	0	0	0	8
MT4 3 1 1	4	2	14	4	0	4	0	0	0	18
MT4 3 2 1	0	4	12	3	0	3	10	0	0	25
MT5 1 1 1	1	1	3	0	1	3	0	0	0	6
MT5 1 1 2	1	2	5	8	2	12	0	0	0	17
MT5 1 2 1	2	0	2	1	1	4	0	0	0	6
MT5 1 2 2	2	0	2	0	0	0	0	0	0	2
MT5 2 1 1	8	5	25	13	0	13	3	0	0	41
MT5 2 2 1	3	0	3	2	1	4	0	0	0	7
MT5 2 2 2	4	0	4	0	3	12	0	0	0	16
MT5 3 1 1	9	1	11	5	0	5	3	0	0	19
MT5 3 1 2	4	2	9	5	1	8	7	0	0	24
MT5 3 2 1	8	1	10	6	0	6	0	0	0	16
MT6 1 1 1	6	5	20	9	4	19	15	0	0	64
MT6 1 1 2	9	1	12	15	0	15	8	2	0	37
MT6 1 2 1	19	2	23	15	0	15	10	3	0	51
MT6 1 2 2	3	4	15	15	0	15	9	0	0	39
MT6 2 1 1	7	2	11	7	0	7	0	0	0	18
MT6 2 2 1	22	2	27	15	5	25	12	8	4	90
MT6 3 1 1	6	1	8	4	0	4	0	0	0	12
MT6 3 1 2	9	4	13	14	2	18	9	0	0	40
MT6 3 2 1	1	5	16	5	5	15	12	4	0	43
MT6 3 2 2	13	4	27	15	6	29	14	0	0	70

**Tab. 7.1: Darstellung einer Auszählung der Rückenmarksschnitte der A3-Zellreihe**

Tabellarisch sind die einzelnen Werte zu je einem Schnitt aufgeführt. Die Zahlenwerte z.B. „1 1 1“ oder „3 1 2“ dienen der Zuordnung. K= Kontrolle, MT1= MT1-MMP usw., M1E= Millimeter 1 Einzelkettenanzahl, M1M= Millimeter 1 Mehrfachkettenanzahl, M1G= Millimeter 1 Gesamtkettenanzahl, M2E= Millimeter 2 Einzelkettenanzahl, M2M= Millimeter 2 Mehrfachkettenanzahl, M2G= Millimeter 2 Gesamtkettenanzahl, M3G= Millimeter 3 Gesamtkettenanzahl, M4G= Millimeter 4 Gesamtkettenanzahl, M5G= Millimeter 5 Gesamtkettenanzahl, GKA= Gesamtkettenanzahl pro Schnitt

## 8. Literaturverzeichnis

1. Abraham, R., et al., *Identification of MMP-15 as an anti-apoptotic factor in cancer cells*. Journal of Biological Chemistry, 2005. 280(40): p. 34123-34132.
2. Al-Ahmad, A.J., et al., *Perlecan domain V modulates astrogliosis in vitro and after focal cerebral ischemia through multiple receptors and increased nerve growth factor release*. Glia, 2011. 59(12): p. 1822-40.
3. Alfonso-Jaume, M.A., R. Mahimkar, and D.H. Lovett, *Co-operative interactions between NFAT (nuclear factor of activated T cells) c1 and the zinc finger transcription factors Spl/Sp3 and Egr-1 regulate MT1-MMP (membrane type 1 matrix metalloproteinase) transcription by glomerular mesangial cells*. Biochemical Journal, 2004. 380: p. 735-747.
4. Astarci, E., A.E. Erson-Bensan, and S. Banerjee, *Matrix metalloprotease 16 expression is downregulated by microRNA-146a in spontaneously differentiating Caco-2 cells*. Dev Growth Differ, 2012. 54(2): p. 216-26.
5. Aumailley, M. and B. Gayraud, *Structure and biological activity of the extracellular matrix*. J Mol Med, 1998. 76(3-4): p. 253-65.
6. Belien, A.T.J., P.A. Paganetti, and M.E. Schwab, *Membrane-type 1 matrix metalloprotease (MT1-MMP) enables invasive migration of glioma cells in central nervous system white matter*. Journal of Cell Biology, 1999. 144(2): p. 373-384.
7. Belkin, A.M., et al., *Matrix-dependent proteolysis of surface transglutaminase by membrane-type metalloproteinase regulates cancer cell adhesion and locomotion*. J Biol Chem, 2001. 276(21): p. 18415-22.
8. Bernstein, J.J., et al., *C6 glioma-astrocytoma cell and fetal astrocyte migration into artificial basement membrane: a permissive substrate for neural tumors but not fetal astrocytes*. Neurosurgery, 1991. 28(5): p. 652-8.
9. Bogler, O., H.J. Huang, and W.K. Cavenee, *Loss of wild-type p53 bestows a growth advantage on primary cortical astrocytes and facilitates their in vitro transformation*. Cancer Res, 1995. 55(13): p. 2746-51.
10. Bogler, O., et al., *The p53 gene and its role in human brain tumors*. Glia, 1995. 15(3): p. 308-27.
11. Bortz, J. and C. Schuster, *Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler*. 7 ed. 2010, Berlin: Springer 655.
12. Brown, G.D. and A.J. Nazarali, *Matrix metalloproteinase-25 has a functional role in mouse secondary palate development and is a downstream target of TGF-beta3*. BMC Dev Biol, 2010. 10: p. 93.
13. Butler, G.S., et al., *The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase "receptor" regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A - A kinetic study*. Journal of Biological Chemistry, 1998. 273(2): p. 871-880.
14. Buttner, F.H., et al., *Membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) cleaves the recombinant aggrecan substrate rAgg1(mut) at the 'aggrecanase' and the MMP sites - Characterization of MT1-MMP catabolic activities on the interglobular domain of aggrecan*. Biochemical Journal, 1998. 333: p. 159-165.
15. Campenot, R.B., K. Lund, and S.A. Mok, *Production of compartmented cultures of rat sympathetic neurons*. Nature Protocols, 2009. 4(12): p. 1869-1887.
16. Chabottaux, V., et al., *Membrane-type 4 matrix metalloproteinase promotes breast cancer growth and metastases*. Cancer Res, 2006. 66(10): p. 5165-72.
17. Chakraborti, S., et al., *Regulation of matrix metalloproteinases: An overview*. Molecular and Cellular Biochemistry, 2003. 253(1-2): p. 269-285.

18. Clark, I.A., et al., *The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors*. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2008. 40(6-7): p. 1362-1378.
19. Collins, V.P., *Brain tumours: Classification and genes*. Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry, 2004. 75: p. 2-11.
20. Crocker, S.J., et al., *Cell and agonist-specific regulation of genes for matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors by primary glial cells*. J Neurochem, 2006. 98(3): p. 812-23.
21. d'Ortho, M.P., et al., *Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases*. European Journal of Biochemistry, 1997. 250(3): p. 751-757.
22. Dalmay, T. and D.R. Edwards, *MicroRNAs and the hallmarks of cancer*. Oncogene, 2006. 25(46): p. 6170-6175.
23. De Palma, A.M., et al., *Increased gelatinase B/matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) activity in a murine model of acute coxsackievirus B4-induced pancreatitis*. Virology, 2008. 382(1): p. 20-7.
24. Dean, R.A., et al., *Identification of candidate angiogenic inhibitors processed by matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) in cell-based proteomic screens: disruption of vascular endothelial growth factor (VEGF)/heparin affinity regulatory peptide (pleiotrophin) and VEGF/Connective tissue growth factor angiogenic inhibitory complexes by MMP-2 proteolysis*. Mol Cell Biol, 2007. 27(24): p. 8454-65.
25. Devy, L. and D.T. Dransfield, *New Strategies for the Next Generation of Matrix-Metalloproteinase Inhibitors: Selectively Targeting Membrane-Anchored MMPs with Therapeutic Antibodies*. Biochem Res Int, 2011. 2011: p. 191670.
26. Egawa, N., et al., *Membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP/MMP-14) cleaves and releases a 22-kDa extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) fragment from tumor cells*. Journal of Biological Chemistry, 2006. 281(49): p. 37576-37585.
27. Egeblad, M. and Z. Werb, *New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression*. Nature Reviews Cancer, 2002. 2(3): p. 161-174.
28. Emmett, C.J., J.M. Lawrence, and P.J. Seeley, *Visualization of migration of transplanted astrocytes using polystyrene microspheres*. Brain Res, 1988. 447(2): p. 223-33.
29. Emmett, C.J., et al., *Cultured epithelioid astrocytes migrate after transplantation into the adult rat brain*. J Comp Neurol, 1991. 311(3): p. 330-41.
30. Endo, K., et al., *Cleavage of syndecan-1 by membrane type matrix metalloproteinase-1 stimulates cell migration*. J Biol Chem, 2003. 278(42): p. 40764-70.
31. English, W.R., et al., *Catalytic activities of membrane-type 6 matrix metalloproteinase (MMP25)*. Febs Letters, 2001. 491(1-2): p. 137-142.
32. English, W.R., et al., *Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis factor-alpha convertase activity but does not activate pro-MMP2*. Journal of Biological Chemistry, 2000. 275(19): p. 14046-14055.
33. Farhat, Y.M., et al., *Gene expression analysis of the pleiotropic effects of TGF-beta1 in an in vitro model of flexor tendon healing*. PLoS One, 2012. 7(12): p. e51411.
34. Fillmore, H.L., T.E. VanMeter, and W.C. Broaddus, *Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMP)s: expression and function during glioma invasion*. Journal of Neuro-Oncology, 2001. 53(2): p. 187-202.
35. Fortin, C.F., et al., *MT6-MMP is present in lipid rafts and faces inward in living human PMNs but translocates to the cell surface during neutrophil apoptosis*. Int Immunol, 2010. 22(8): p. 637-49.
36. Fosang, A.J., et al., *Membrane-type 1 MMP (MMP-14) cleaves at three sites in the aggrecan interglobular domain*. Febs Letters, 1998. 430(3): p. 186-190.

37. Fronicke, L., et al., *A comparative map of the porcine and human genomes demonstrates ZOO-FISH and gene mapping-based chromosomal homologies*. Mamm Genome, 1996. 7(4): p. 285-90.
38. Gagliano, N., et al., *Glioma-astrocyte interaction modifies the astrocyte phenotype in a co-culture experimental model*. Oncol Rep, 2009. 22(6): p. 1349-56.
39. Gao, G., et al., *ADAMTS4 (aggrecanase-1) activation on the cell surface involves C-terminal cleavage by glycosylphosphatidyl inositol-anchored membrane type 4-matrix metalloproteinase and binding of the activated proteinase to chondroitin sulfate and heparan sulfate on syndecan-1*. J Biol Chem, 2004. 279(11): p. 10042-51.
40. Giese, A. and M. Westphal, *Glioma invasion in the central nervous system*. Neurosurgery, 1996. 39(2): p. 235-50; discussion 250-2.
41. Giese, A., et al., *Determinants of human astrocytoma migration*. Cancer Res, 1994. 54(14): p. 3897-904.
42. Giese, A., et al., *Substrates for astrocytoma invasion*. Neurosurgery, 1995. 37(2): p. 294-301; discussion 301-2.
43. Gong, Y., et al., *Inflammatory macrophage migration requires MMP-9 activation by plasminogen in mice*. J Clin Invest, 2008. 118(9): p. 3012-24.
44. Groft, L.L., et al., *Differential expression and localization of TIMP-1 and TIMP-4 in human gliomas*. Br J Cancer, 2001. 85(1): p. 55-63.
45. Guo, P., et al., *UP-regulation of angiopoietin-2, matrix metalloprotease-2, membrane type 1 metalloprotease, and laminin 5 gamma 2 correlates with the invasiveness of human glioma*. American Journal of Pathology, 2005. 166(3): p. 877-890.
46. Haas, T.L., et al., *Egr-1 mediates extracellular matrix-driven transcription of membrane type 1 matrix metalloproteinase in endothelium*. Journal of Biological Chemistry, 1999. 274(32): p. 22679-22685.
47. Hadler-Olsen, E., et al., *Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease*. FEBS J, 2011. 278(1): p. 28-45.
48. Hagemann, C., et al., *Comparative expression pattern of Matrix-Metalloproteinases in human glioblastoma cell-lines and primary cultures*. BMC Res Notes, 2010. 3: p. 293.
49. Hamel, M.G., J. Mayer, and P.E. Gottschall, *Altered production and proteolytic processing of brevican by transforming growth factor beta in cultured astrocytes*. J Neurochem, 2005. 93(6): p. 1533-41.
50. Handler, M., P.D. Yurchenco, and R.V. Iozzo, *Developmental expression of perlecan during murine embryogenesis*. Dev Dyn, 1997. 210(2): p. 130-45.
51. Hayashita-Kinoh, H., et al., *Membrane-type 5 matrix metalloproteinase is expressed in differentiated neurons and regulates axonal growth*. Cell Growth Differ, 2001. 12(11): p. 573-80.
52. Held-Feindt, J., et al., *Matrix-degrading proteases ADAMTS4 and ADAMTS5 (disintegrins and metalloproteinases with thrombospondin motifs 4 and 5) are expressed in human glioblastomas*. Int J Cancer, 2006. 118(1): p. 55-61.
53. Hernandez-Barrantes, S., et al., *Regulation of membrane type-matrix metalloproteinases*. Seminars in Cancer Biology, 2002. 12(2): p. 131-138.
54. Hiraoka, N., et al., *Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins*. Cell, 1998. 95(3): p. 365-377.
55. Holmbeck, K., et al., *MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover*. Cell, 1999. 99(1): p. 81-92.
56. Hur, J.H., et al., *Matrix metalloproteinases in human gliomas: activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) may be correlated with membrane-type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) expression*. J Korean Med Sci, 2000. 15(3): p. 309-14.



57. Hurskainen, T., et al., *Production of membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT-MMP-1) in early human placenta. A possible role in placental implantation?* J Histochem Cytochem, 1998. 46(2): p. 221-9.
58. Iida, J., et al., *Membrane type-1 matrix metalloproteinase promotes human melanoma invasion and growth.* J Invest Dermatol, 2004. 122(1): p. 167-76.
59. Imai, K., et al., *Membrane-type matrix metalloproteinase 1 is a gelatinolytic enzyme and is secreted in a complex with tissue inhibitor of metalloproteinases 2.* Cancer Research, 1996. 56(12): p. 2707-2710.
60. Iozzo, R.V. and J.D. San Antonio, *Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena.* J Clin Invest, 2001. 108(3): p. 349-55.
61. Ip, Y.C., S.T. Cheung, and S.T. Fan, *Atypical localization of membrane type 1-matrix metalloproteinase in the nucleus is associated with aggressive features of hepatocellular carcinoma.* Mol Carcinog, 2007. 46(3): p. 225-30.
62. Ironside, J.W., et al., *Diagnostic Pathology of Nervous System Tumors.* 2002: Churchill Livingstone. 55-114.
63. Itoh, Y., et al., *Astrocytes and pericytes cooperatively maintain a capillary-like structure composed of endothelial cells on gel matrix.* Brain Res, 2011. 1406: p. 74-83.
64. Jaworski, D.M., *Developmental regulation of membrane type-5 matrix metalloproteinase (MT5-MMP) expression in the rat nervous system.* Brain Res, 2000. 860(1-2): p. 174-7.
65. Jiang, Y. and R.J. Muschel, *Regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) by translational efficiency in murine prostate carcinoma cells.* Cancer Res, 2002. 62(6): p. 1910-4.
66. Kaczarek, E., et al., *Dissecting glioma invasion: interrelation of adhesion, migration and intercellular contacts determine the invasive phenotype.* Int J Dev Neurosci, 1999. 17(5-6): p. 625-41.
67. Kang, T., et al., *Subcellular distribution and cytokine- and chemokine-regulated secretion of leukolysin/MT6-MMP/MMP-25 in neutrophils.* J Biol Chem, 2001. 276(24): p. 21960-8.
68. Kanwar, Y.S., et al., *Role of membrane-type matrix metalloproteinase 1 (MT-1-MMP), MMP-2, and its inhibitor in nephrogenesis.* American Journal of Physiology-Renal Physiology, 1999. 277(6): p. F934-F947.
69. Kinoh, H., et al., *Assignment of the genes for membrane-type-4 matrix metalloproteinase (Mmp17, MMP17) to mouse chromosome 5, human chromosome band 12q24.3 and membrane-type-5 matrix metalloproteinase (Mmp24, MMP24) to mouse chromosome 2 and human chromosome band 20q11.2-->q12, respectively, by radiation hybrid and in situ hybridization.* Cytogenet Cell Genet, 1999. 87(1-2): p. 97-8.
70. Kleihues, P., *Klassifikation, Grading und genetisches Profil der Gliome,* in Schweizer Zeitschrift für Onkologie. 2007. p. 5-9.
71. Knauper, V., et al., *Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation - Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase A (MMP-2) are able to generate active enzyme.* Journal of Biological Chemistry, 1996. 271(29): p. 17124-17131.
72. Koehler, M.R., et al., *Localization of the human membrane-type 2 matrix metalloproteinase gene (MMP15) to 16q12.1 near DNA elements that are part of centromeric and non-centromeric heterochromatin of 11 human chromosomes.* Chromosome Res, 1998. 6(3): p. 199-203.
73. Kojima, S., et al., *Membrane-type 6 matrix metalloproteinase (MT6-MMP, MMP-25) is the second glycosyl-phosphatidyl inositol (GPI)-anchored MMP.* FEBS Lett, 2000. 480(2-3): p. 142-6.
74. Kolkenbrock, H., et al., *Biochemical characterization of the catalytic domain of membrane-type 4 matrix metalloproteinase.* Biological Chemistry, 1999. 380(9): p. 1103-1108.

75. Koshikawa, N., et al., *Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5* (vol 148, pg 615, 2000). *Journal of Cell Biology*, 2000. 151(2): p. 479-479.
76. Kuo, Y.C., et al., *Transforming growth factor-beta induces CD44 cleavage that promotes migration of MDA-MB-435s cells through the up-regulation of membrane type 1-matrix metalloproteinase*. *Int J Cancer*, 2009. 124(11): p. 2568-76.
77. Lampert, K., et al., *Expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in human brain tumors*. *American Journal of Pathology*, 1998. 153(2): p. 429-437.
78. Landazuri, N., et al., *Retrovirus-polymer complexes: study of the factors affecting the dose response of transduction*. *Biotechnol Prog*, 2007. 23(2): p. 480-7.
79. Lee, B., et al., *Perlecan domain V is neuroprotective and proangiogenic following ischemic stroke in rodents*. *J Clin Invest*, 2011. 121(8): p. 3005-23.
80. Lee, M.H., et al., *Threonine 98, the pivotal residue of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 in metalloproteinase recognition*. *Journal of Biological Chemistry*, 2004. 279(17): p. 17562-17569.
81. Levicar, N., R.K. Nutall, and T.T. Lah, *Proteases in brain tumour progression*. *Acta Neurochirurgica*, 2003. 145(9): p. 825-838.
82. Ling, T.L. and J. Stone, *The development of astrocytes in the cat retina: evidence of migration from the optic nerve*. *Brain Res Dev Brain Res*, 1988. 44(1): p. 73-85.
83. Llano, E., et al., *Identification and characterization of human MT5-MMP, a new membrane-bound activator of progelatinase A overexpressed in brain tumors*. *Cancer Research*, 1999. 59(11): p. 2570-2576.
84. Lohi, J., et al., *Structural analysis and promoter characterization of the human membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) gene*. *Gene*, 2000. 242(1-2): p. 75-86.
85. Louis, D.N., et al., *The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system*. *Acta Neuropathol*, 2007. 114(2): p. 97-109.
86. Ma, J., et al., *Human U87 astrocytoma cell invasion induced by interaction of betaig-h3 with integrin alpha5beta1 involves calpain-2*. *PLoS One*, 2012. 7(5): p. e37297.
87. Manon-Jensen, T., H.A. Multhaupt, and J.R. Couchman, *Mapping of MMP cleavage sites on syndecan-1 and syndecan-4 ectodomains*. *FEBS J*, 2013.
88. Markovic, D.S., et al., *Gliomas induce and exploit microglial MT1-MMP expression for tumor expansion*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009. 106(30): p. 12530-12535.
89. Matsumoto, S., et al., *Identification of soluble type of membrane-type matrix metalloproteinase-3 formed by alternatively spliced mRNA*. *Biochim Biophys Acta*, 1997. 1354(2): p. 159-70.
90. Mattei, M.G., et al., *Genes of the membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene family, MMP14, MMP15, and MMP16, localize to human chromosomes 14, 16, and 8, respectively*. *Genomics*, 1997. 40(1): p. 168-9.
91. Matthews, R.T., et al., *Brain-enriched hyaluronan binding (BEHAB)/brevican cleavage in a glioma cell line is mediated by a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS) family member*. *J Biol Chem*, 2000. 275(30): p. 22695-703.
92. McClung, H.M., et al., *SPARC upregulates MT1-MMP expression, MMP-2 activation, and the secretion and cleavage of galectin-3 in U87MG glioma cells*. *Neurosci Lett*, 2007. 419(2): p. 172-7.
93. McQuibban, G.A., et al., *Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo*. *Blood*, 2002. 100(4): p. 1160-7.
94. McQuibban, G.A., et al., *Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine*

- stromal cell-derived factor-1*. J Biol Chem, 2001. 276(47): p. 43503-8.
95. Milner, R., et al., *Responses of endothelial cell and astrocyte matrix-integrin receptors to ischemia mimic those observed in the neurovascular unit*. Stroke, 2008. 39(1): p. 191-7.
  96. Milner, R., et al., *Increased expression of fibronectin and the alpha 5 beta 1 integrin in angiogenic cerebral blood vessels of mice subject to hypobaric hypoxia*. Mol Cell Neurosci, 2008. 38(1): p. 43-52.
  97. Mohan, H., et al., *Extracellular matrix in multiple sclerosis lesions: Fibrillar collagens, biglycan and decorin are upregulated and associated with infiltrating immune cells*. Brain Pathol, 2010. 20(5): p. 966-75.
  98. Moore, C.S., et al., *Astrocytic tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) promotes oligodendrocyte differentiation and enhances CNS myelination*. J Neurosci, 2011. 31(16): p. 6247-54.
  99. Morrison, C.J., et al., *Cellular activation of MMP-2 (gelatinase A) by MT2-MMP occurs via a TIMP-2-independent pathway*. Journal of Biological Chemistry, 2001. 276(50): p. 47402-47410.
  100. Moss, M.L. and F.H. Rasmussen, *Fluorescent substrates for the proteinases ADAM17, ADAM10, ADAM8, and ADAM12 useful for high-throughput inhibitor screening*. Anal Biochem, 2007. 366(2): p. 144-8.
  101. Moss, M.L., et al., *ADAM9 inhibition increases membrane activity of ADAM10 and controls alpha-secretase processing of amyloid precursor protein*. J Biol Chem, 2011. 286(47): p. 40443-51.
  102. Nabeshima, K., et al., *Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration*. Pathol Int, 2002. 52(4): p. 255-64.
  103. Nagase H., W.F., *Matrix Metalloproteinases*. The Journal of Biological Chemistry, 1999. 274: p. 21491-21494.
  104. Nakada, M., et al., *Expression and tissue localization of membrane-type 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human astrocytic tumors*. American Journal of Pathology, 1999. 154(2): p. 417-428.
  105. Nakahara, H., et al., *Transmembrane/cytoplasmic domain-mediated membrane type 1-matrix metalloprotease docking to invadopodia is required for cell invasion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(15): p. 7959-64.
  106. Nuttall, R.K., et al., *Elevated membrane-type matrix metalloproteinases in gliomas revealed by profiling proteases and inhibitors in human cancer cells*. Mol Cancer Res, 2003. 1(5): p. 333-45.
  107. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Genetic profile of astrocytic and oligodendroglial gliomas*. Brain Tumor Pathol, 2011.
  108. Ohuchi, E., et al., *Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules*. Journal of Biological Chemistry, 1997. 272(4): p. 2446-2451.
  109. Okada, A., et al., *Expression of matrix metalloproteinases during rat skin wound healing: Evidence that membrane type-1 matrix metalloproteinase is a stromal activator of pro-gelatinase A*. Journal of Cell Biology, 1997. 137(1): p. 67-77.
  110. Okada, A., et al., *Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene is expressed in stromal cells of human colon, breast, and head and neck carcinomas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(7): p. 2730-4.
  111. Okumura, Y., et al., *Proteolytic activation of the precursor of membrane type 1 matrix metalloproteinase by human plasmin - A possible cell surface activator*. Febs Letters, 1997. 402(2-3): p. 181-184.
  112. Ostrom, Q.T., et al., *CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system*

- tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. Neuro Oncol*, 2013. 15 Suppl 2: p. ii1-56.
113. Pagenstecher, A., et al., *Differential expression of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase genes in the mouse central nervous system in normal and inflammatory states. Am J Pathol*, 1998. 152(3): p. 729-41.
  114. Paladino, S., et al., *GPI-anchored proteins are directly targeted to the apical surface in fully polarized MDCK cells. J Cell Biol*, 2006. 172(7): p. 1023-34.
  115. Pei, D., *Leukolysin/MMP25/MT6-MMP: a novel matrix metalloproteinase specifically expressed in the leukocyte lineage. Cell Res*, 1999. 9(4): p. 291-303.
  116. Pei, D.Q., *Identification and characterization of the fifth membrane-type matrix metalloproteinase MT5-MMP. Journal of Biological Chemistry*, 1999. 274(13): p. 8925-8932.
  117. Plaisier, M., et al., *Involvement of membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in capillary tube formation by human endometrial microvascular endothelial cells: role of MT3-MMP. J Clin Endocrinol Metab*, 2004. 89(11): p. 5828-36.
  118. Polette, M. and P. Birembaut, *Membrane-type metalloproteinases in tumor invasion. Int J Biochem Cell Biol*, 1998. 30(11): p. 1195-202.
  119. Preusser, M., C. Haberler, and J.A. Hainfellner, *Malignant glioma: neuropathology and neurobiology. Wien Med Wochenschr*, 2006. 156(11-12): p. 332-7.
  120. Puente, X.S., et al., *Molecular cloning of a novel membrane-type matrix metalloproteinase from a human breast carcinoma. Cancer Research*, 1996. 56(5): p. 944-949.
  121. Ra, H.J. and W.C. Parks, *Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. Matrix Biology*, 2007. 26(8): p. 587-596.
  122. Radichev, I.A., et al., *Biochemical Characterization of the Cellular Glycosylphosphatidylinositol-linked Membrane Type-6 Matrix Metalloproteinase. Journal of Biological Chemistry*, 2010. 285(21): p. 16076-16086.
  123. Ramos-DeSimone, N., et al., *Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. J Biol Chem*, 1999. 274(19): p. 13066-76.
  124. Reina, M.A., et al., *Ultrastructural findings in human spinal pia mater in relation to subarachnoid anesthesia. Anesth Analg*, 2004. 98(5): p. 1479-85, table of contents.
  125. Remacle, A., G. Murphy, and C. Roghi, *Membrane type I-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) is internalised by two different pathways and is recycled to the cell surface. Journal of Cell Science*, 2003. 116(19): p. 3905-3916.
  126. Roberts, J., M.P. Kahle, and G.J. Bix, *Perlecan and the blood-brain barrier: beneficial proteolysis? Front Pharmacol*, 2012. 3: p. 155.
  127. Roghi, C., et al., *Golgi reassembly stacking protein 55 interacts with membrane-type (MT) 1-matrix metalloprotease (MMP) and furin and plays a role in the activation of the MT1-MMP zymogen. Febs Journal*, 2010. 277(15): p. 3158-3175.
  128. Rollason, R., et al., *Clathrin-mediated endocytosis of a lipid-raft-associated protein is mediated through a dual tyrosine motif. J Cell Sci*, 2007. 120(Pt 21): p. 3850-8.
  129. Rozanov, D.V., et al., *The low density lipoprotein receptor-related protein LRP is regulated by membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) proteolysis in malignant cells. J Biol Chem*, 2004. 279(6): p. 4260-8.
  130. Sameshima, T., et al., *Glioma cell extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) (CD147) stimulates production of membrane-type matrix metalloproteinases and activated gelatinase A in co-cultures with brain-derived fibroblasts. Cancer Letters*, 2000. 157(2): p. 177-184.
  131. Sato, H., et al., *Assignment of the human genes for membrane-type-1, -2, and -3 matrix metalloproteinases (MMP14, MMP15, and MMP16) to 14q12.2, 16q12.2-q21, and 8q21,*

- respectively, by *in situ* hybridization. *Genomics*, 1997. 39(3): p. 412-3.
132. Sato, H., et al., *A MATRIX METALLOPROTEINASE EXPRESSED ON THE SURFACE OF INVASIVE TUMOR-CELLS*. *Nature*, 1994. 370(6484): p. 61-65.
  133. Scheef, E., et al., *Isolation and characterization of murine retinal astrocytes*. *Mol Vis*, 2005. 11: p. 613-24.
  134. Schwartzbaum, J.A., et al., *Epidemiology and molecular pathology of glioma*. *Nat Clin Pract Neurol*, 2006. 2(9): p. 494-503; quiz 1 p following 516.
  135. Seiki, M., N. Koshikawa, and I. Yana, *Role of pericellular proteolysis by membrane-type 1 matrix metalloproteinase in cancer invasion and angiogenesis*. *Cancer Metastasis Rev*, 2003. 22(2-3): p. 129-43.
  136. Shi, J., et al., *Membrane-type MMPs enable extracellular matrix permissiveness and mesenchymal cell proliferation during embryogenesis*. *Dev Biol*, 2008. 313(1): p. 196-209.
  137. Shimada, T., et al., *Characterization of a truncated recombinant form of human membrane type 3 matrix metalloproteinase*. *European Journal of Biochemistry*, 1999. 262(3): p. 907-914.
  138. Shiryayev, S.A., et al., *Matrix metalloproteinase proteolysis of the myelin basic protein isoforms is a source of immunogenic peptides in autoimmune multiple sclerosis*. *PLoS One*, 2009. 4(3): p. e4952.
  139. Shofuda, K., et al., *Expression of three membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in rat vascular smooth muscle cells and characterization of MT3-MMPs with and without transmembrane domain*. *Journal of Biological Chemistry*, 1997. 272(15): p. 9749-9754.
  140. Sohail, A., et al., *MT4-(MMP17) and MT6-MMP (MMP25), A unique set of membrane-anchored matrix metalloproteinases: properties and expression in cancer*. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2008. 27(2): p. 289-302.
  141. Sohail, A., et al., *Characterization of the dimerization interface of membrane type 4 (MT4)-matrix metalloproteinase*. *J Biol Chem*, 2011. 286(38): p. 33178-89.
  142. Starr, A.E., et al., *Biochemical characterization and N-terminomics analysis of leukolysin, the membrane-type 6 matrix metalloprotease (MMP25): chemokine and vimentin cleavages enhance cell migration and macrophage phagocytic activities*. *J Biol Chem*, 2012. 287(16): p. 13382-95.
  143. Sternlicht, M.D. and Z. Werb, *How matrix metalloproteinases regulate cell behavior*. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2001. 17: p. 463-516.
  144. Stijlemans, B., et al., *A glycosylphosphatidylinositol-based treatment alleviates trypanosomiasis-associated immunopathology*. *J Immunol*, 2007. 179(6): p. 4003-14.
  145. Strongin, A.Y., et al., *Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease*. *J Biol Chem*, 1995. 270(10): p. 5331-8.
  146. Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. *N Engl J Med*, 2005. 352(10): p. 987-96.
  147. Sun, Q., et al., *MMP25 (MT6-MMP) is highly expressed in human colon cancer, promotes tumor growth, and exhibits unique biochemical properties*. *J Biol Chem*, 2007. 282(30): p. 21998-2010.
  148. Sykova, E. and C. Nicholson, *Diffusion in brain extracellular space*. *Physiol Rev*, 2008. 88(4): p. 1277-340.
  149. Takino, T., et al., *IDENTIFICATION OF THE 2ND MEMBRANE-TYPE MATRIX METALLOPROTEINASE (MT-MMP-2) GENE FROM A HUMAN PLACENTA CDNA LIBRARY - MT-MMPS FORM A UNIQUE MEMBRANE-TYPE SUBCLASS IN THE MMP FAMILY*. *Journal of Biological Chemistry*, 1995. 270(39): p. 23013-23020.

150. Takino, T., et al., *Cleavage of metastasis suppressor gene product KiSS-1 protein/metastin by matrix metalloproteinases*. *Oncogene*, 2003. 22(30): p. 4617-26.
151. Thier, M., et al., *Expression of matrix metalloproteinase-2 in glial and neuronal tumor cell lines: inverse correlation with proliferation rate*. *Cancer Lett*, 2000. 149(1-2): p. 163-70.
152. Thomas, G., *Furin at the cutting edge: From protein traffic to embryogenesis and disease*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2002. 3(10): p. 753-766.
153. Timpl, R., *Macromolecular organization of basement membranes*. *Curr Opin Cell Biol*, 1996. 8(5): p. 618-24.
154. Toth, M., et al., *Complex pattern of membrane type 1 matrix metalloproteinase shedding. Regulation by autocatalytic cells surface inactivation of active enzyme*. *J Biol Chem*, 2002. 277(29): p. 26340-50.
155. Tryggvason, K., M. Hoyhtya, and T. Salo, *Proteolytic degradation of extracellular matrix in tumor invasion*. *Biochim Biophys Acta*, 1987. 907(3): p. 191-217.
156. Urena, J.M., et al., *The cytoplasmic carboxy-terminal amino acid determines the subcellular localization of proTGF-(alpha) and membrane type matrix metalloprotease (MT1-MMP)*. *J Cell Sci*, 1999. 112 ( Pt 6): p. 773-84.
157. Van den Steen, P.E., et al., *Matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of MMPs and TACE in experimental cerebral malaria*. *Lab Invest*, 2006. 86(9): p. 873-88.
158. Van Meter, T.E., et al., *Induction of membrane-type-1 matrix metalloproteinase by epidermal growth factor-mediated signaling in gliomas*. *Neuro-Oncology*, 2004. 6(3): p. 188-199.
159. Vanwart, H.E. and H. Birkedal-hansen, *THE CYSTEINE SWITCH - A PRINCIPLE OF REGULATION OF METALLOPROTEINASE ACTIVITY WITH POTENTIAL APPLICABILITY TO THE ENTIRE MATRIX METALLOPROTEINASE GENE FAMILY*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990. 87(14): p. 5578-5582.
160. Velasco, G., et al., *Human MT6-matrix metalloproteinase: Identification, progelatinase A activation, and expression in brain tumors*. *Cancer Research*, 2000. 60(4): p. 877-882.
161. Viapiano, M.S. and R.T. Matthews, *From barriers to bridges: chondroitin sulfate proteoglycans in neuropathology*. *Trends Mol Med*, 2006. 12(10): p. 488-96.
162. Vincenti, M.P. and C.E. Brinckerhoff, *Signal transduction and cell-type specific regulation of matrix metalloproteinase gene expression: Can MMPs be good for you?* *Journal of Cellular Physiology*, 2007. 213: p. 355-364.
163. Vu, T.H. and Z. Werb, *Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology*. *Genes & Development*, 2000. 14(17): p. 2123-2133.
164. Wang, Y., et al., *Catalytic activities and substrate specificity of the human membrane type 4 matrix metalloproteinase catalytic domain*. *J Biol Chem*, 1999. 274(46): p. 33043-9.
165. Westphal, M. and K. Lamszus, *The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches*. *Nat Rev Neurosci*, 2011. 12(9): p. 495-508.
166. Will, H. and B. Hinzmann, *CDNA SEQUENCE AND MESSENGER-RNA TISSUE DISTRIBUTION OF A NOVEL HUMAN MATRIX METALLOPROTEINASE WITH A POTENTIAL TRANSMEMBRANE SEGMENT*. *European Journal of Biochemistry*, 1995. 231(3): p. 602-608.
167. Wolf, K., et al., *Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion*. *Nat Cell Biol*, 2007. 9(8): p. 893-904.
168. Xu, X.T., et al., *MicroRNA expression profiling identifies miR-328 regulates cancer stem cell-like SP cells in colorectal cancer*. *Br J Cancer*, 2012. 106(7): p. 1320-30.
169. Yahanda, A.M., et al., *Astrocytes derived from p53-deficient mice provide a multistep in vitro model for development of malignant gliomas*. *Mol Cell Biol*, 1995. 15(8): p. 4249-59.

170. Yang, Y., et al., *Increased intranuclear matrix metalloproteinase activity in neurons interferes with oxidative DNA repair in focal cerebral ischemia*. J Neurochem, 2010. 112(1): p. 134-49.
171. Young, D.A., et al., *Histone deacetylase inhibitors modulate metalloproteinase gene expression in chondrocytes and block cartilage resorption*. Arthritis Research & Therapy, 2005. 7(3): p. R503-R512.
172. Yurchenco, P.D. and J.J. O'Rear, *Basal lamina assembly*. Curr Opin Cell Biol, 1994. 6(5): p. 674-81.
173. Zhang, E.T., C.B. Inman, and R.O. Weller, *Interrelationships of the pia mater and the perivascular (Virchow-Robin) spaces in the human cerebrum*. J Anat, 1990. 170: p. 111-23.
174. Zhang, J., S. Sarkar, and V.W. Yong, *The chemokine stromal cell derived factor-1 (CXCL12) promotes glioma invasiveness through MT2-matrix metalloproteinase*. Carcinogenesis, 2005. 26(12): p. 2069-2077.
175. Zhao, H., et al., *Differential inhibition of membrane type 3 (MT3)-matrix metalloproteinase (MMP) and MT1-MMP by tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 and TIMP-3 regulates pro-MMP-2 activation*. J Biol Chem, 2004. 279(10): p. 8592-601.
176. Zhou, Y., et al., *CXCR4 is a major chemokine receptor on glioma cells and mediates their survival*. J Biol Chem, 2002. 277(51): p. 49481-7.
177. Zhou, Z.J., et al., *Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase I*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. 97(8): p. 4052-4057.
178. Zimmermann, D.R. and M.T. Dours-Zimmermann, *Extracellular matrix of the central nervous system: from neglect to challenge*. Histochem Cell Biol, 2008. 130(4): p. 635-53.

#### Internetquellen:

1. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>

## 9. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AMP	<i>ampicillin-site</i>
AP	Aktivatorprotein
APS	Ammoniumpersulfat
aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BM	Basalmembran
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CD44	<i>Cluster of differentiation 44</i>
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CTP	Cytosintriphosphat
DMEM	Dulbecco`s modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleidacid</i> (Desoxyribonukleidsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DPBS	Dulbecco`sPhosphate Buffered Saline
DPM	<i>dot per millimeter</i>
DTT	Dithiotreitol
DR	<i>downregulator of</i>
	<i>transcription</i>
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetra-acetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>



## Abkürzungsverzeichnis

eGFP	<i>enhanced GFP</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
Egr	<i>early growth response protein</i>
Ets	<i>erythroblastosis twenty six</i>
EZM	Extrazellulärmatrix
FACIT	„fibrill-associated collagens with interrupted triple-helices“
FBS	Fetal Bovine Serum
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
g	„G-force“ (Gravitationskraft)
gr	Gramm
GFP	<i>green fluorescence protein</i>
<i>gfp</i>	Gen des <i>green fluorescence protein</i>
GPI	Glycosylphosphatidyl-inositol
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS	<i>Hank`s Buffered Salt Solution</i>
HCl	Salzsäure
HDaCi	Histon-Deacetylase-Inhibitoren
HEPES	2-(4-(w-Hydroxyethyl)-1- piperaziny) ethansulfonsäure
hMT-MMPs	Humane MT-MMPs
H <sub>2</sub> O	Wasser
ICAM-1	<i>Intercellular adhesive molecule-1</i>
kb	Kilobasen
IL	Interleukin
IRES	<i>internal ribosomal encoding site</i>
IS	Insertionssequenz
Kb	Kilobasen
LB	Lysogeny Broth
Lef	<i>lymphoid enhancer factors</i>

## Abkürzungsverzeichnis

LTR	<i>long terminal repeat</i>
M	molar
max.	Maximal
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
hMT-MMP	humanes MT-MMP
Min.	Minute
Mir	MicroRNA
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP	Matrixmetalloproteinase
mMT-MMP	murines MT-MMP
mRNA	<i>messenger ribonucleid acid</i> , Boten-RNA
MT-MMP	<i>membrane-type-matrixmetallo-proteinase</i>
<i>mt-mmp</i>	Gen der MT-MMPs
MT-MMP	Protein der MT-MMPs
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NFκB	<i>nuclear Factor Kappa B</i>
ng	nanogramm
OPoSSM	<i>Organotypic porcine spinal splice migration</i>
ORI	<i>origin of replication</i>
PCR	<i>polymerase-chain-reaction</i>
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>

## Abkürzungsverzeichnis

prom	Promoter
PIPES	Piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)
QIA	Quiagen
RAR	<i>retinoic acid response element</i>
RB	Retinoblastom
RIPA	Radioimmunopräzipitations- assay
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
RPA	RNase-Protection-Assay
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RXR	<i>retinoic x response element</i>
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
SB	<i>Sodium Borate Buffer</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
Sek.	Sekunden
SPARC	<i>secreted protein, acidic and zinc in cysteine</i>
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
Std.	Stunden
s. o.	Siehe oben
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Base, Ethansäure ( <i>acetic acid</i> ) und EDT
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
Tcf	<i>T-cell factor</i>
TEMED	Tetramethylethylen-diamin
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor</i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of matrixmetallo-proteinases</i>
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$

## Abkürzungsverzeichnis

tRNA	Transfer-RNA
UTP	Uridintriphosphat
VEGF	<i>vascular endothelial growth facor</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 10. Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.1:Entwicklung der Astrozytome .....	3
Abb. 3.2: Proteinstruktur der MT-MMP .....	9
Abb. 3.3: IS-Insertionssequenzen .....	10
Abb. 3.4: Promoterbindungsstellen .....	11
Abb. 3.5: Proteolytische und Non-Proteolytische Aktivierung der MMP.....	12
Abb. 3.6: Funktionen der MMP.....	14
Abb. 3.7: MT1-MMP und TIMP-2 abhängige Aktivierung von MMP-2.....	15
Abb. 4.1: MIGR-I .....	22
Abb. 4.2: MCS-Sequenz des MIGR-I-Vektors .....	23
Abb. 4.3: MCS-Sequenz des neuen MIGR-II-Vektors .....	23
Abb. 4.4: Matrigel-Invasions-Assay .....	52
Abb. 4.5: Schematischer Aufbau des OPoSSM-Assay .....	53
Abb. 5.1: Kontrollverdau des MIGR-II .....	58
Abb. 5.2: SB-Agarose-Gel der Versuchstier-Genotypisierung .....	59
Abb. 5.3: Transfizierte Phoenixzellen .....	60
Abb. 5.4: MT6-MMP transduzierte Astrozyten.....	60
Abb. 5.5: Kontrollvektor- und MT-MMP transduzierte Astrozyten .....	61
Abb. 5.6 A: Nachweis der murinen MT1-MT5-MMP RNA in den Kontrollastrozyten und den MT-MMP transduzierten Astrozyten .....	62
Abb. 5.6 B: Nachweis der murinen MT6-MMP RNA in den Kontrollastrozyten und den MT-MMP transduzierten Astrozyten. ....	63
Abb. 5.7: Nachweis der humanen MT-MMP RNA .....	64
Abb. 5.8: Nachweis der TIMP RNA.....	65
Abb. 5.9: Western-Blot für MT1-MMP .....	66
Abb. 5.10: Intensitätsmessung der MT1-MMP-Banden des Western Blots.....	67
Abb. 5.11: Western-Blot für MT2-MMP .....	68
Abb. 5.12: Western-Blot für MT3-MMP .....	68
Abb. 5.13: Western-Blot für MT4-MMP.....	69
Abb. 5.14: Intensitätsmessung der MT4-MMP-Banden des Western Blots.....	69
Abb. 5.15: Western-Blot für MT5-MMP.....	70

Abb. 5.16: Western Blot für MT6-MMP .....	70
Abb. 5.17: Immunzytochemischer Nachweis für die hMT-MMPs in murinen Tp53 <sup>-/-</sup> -Astrozyten.....	71
Abb. 5.18: Gelatin-Zymographie mit konditionierten Überständen der transduzierten Astrozyten.....	72
Abb. 5.19: Intensitätsmessung der Gelatin-Zymographie .....	73
Abb. 5.20: U87-Gelatin-Zymographie .....	74
Abb. 5.21: Ergebnisse des Peptid-Substratassays mit dem MT1-Substrat.....	75
Abb. 5.22: Ergebnisse des Peptid-Substratassays mit PEPDab005 (TNF- $\alpha$ ).....	75
Abb. 5.23: Ergebnisse des Peptid-Substratassays mit PEPDab008 (proCha) .....	76
Abb. 5.24: <i>Scratch</i> -Assay .....	77
Abb. 5.25: Gesamtergebnis aller sechs Messungen des <i>Scratch</i> -Assays .....	78
Abb. 5.26: MT1-MMP transduzierte Astrozyten und U87-Glioblastomzellen auf der Membran und dem Matrigel .....	79
Abb. 5.27: Aufbau und Verlauf des OPoSSM-Assay .....	80
Abb. 5.28: Rückenmarksschnitt in der Fluoreszenzdarstellung .....	81
Abb. 5.29: Darstellung unterschiedlicher Ebenen im Rückenmarksschnitt .....	82
Abb. 5.30: Semidünnschnitt eines Rückenmarkschnittes.....	83
Abb. 5.31: Boxplot der Gesamtkettenanzahl.....	84
Abb. 5.32: Infiltrationstiefe der Astrozytenketten .....	85
Abb. 7.1: PSG-5-Vektor .....	106
Abb. 7.2: Kontrollverdau des MIGR-I mit <i>mt1-mmp</i> und des <i>mt2-mmp</i> .....	106
Abb. 7.3: Kontrollverdau des MIGR-I mit <i>mt3-mmp</i> in den und des MIGR-II mit <i>mt4-mmp</i> .....	107
Abb. 7.4: Kontrollverdau des MIGR-II mit <i>mt5-mmp</i> und des <i>mt6-mmp</i> .....	107

## 11. Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1: WHO-Grade.....	4
Tab. 3.2: Epidemiologie der Astrozytom-Entitäten in Abhängigkeit vom Alter .....	5
Tab. 3.3: Einteilung der MMP .....	7
Tab. 3.4: Genetische Informationen zu den humanen MT-MMPs .....	8
Tab. 3.5: Bindungsfaktoren zugeordnet zu den Bindungsstellen .....	11
Tab. 3.6: Substrate der MT-MMP .....	16
Tab. 3.7: Expressionsmuster der MT-MMP in den Astrozytomentitäten .....	20
Tab. 4.1: TAE-Gel.....	24
Tab. 4.2: LB-Medium .....	25
Tab. 4.3: Mini-Präparation.....	26
Tab. 4.4: P1-3 Lösungen.....	27
Tab. 4.5: SB-Gel .....	27
Tab. 4.6: DNA-Isolierung (PCR).....	29
Tab. 4.7: PCR-Primer .....	29
Tab. 4.8: PCR-Ansatz .....	30
Tab. 4.9: PCR-Zyklus .....	30
Tab. 4.10: Transfektion der Phoenixzellen .....	31
Tab. 4.11: Kulturmedium und Transfektionsansätze .....	32
Tab. 4.12: Trypsin-Lösung.....	32
Tab. 4.13: Triturationslösung.....	33
Tab. 4.14: RNA-Extraktion .....	34
Tab. 4.15: RPA-Reagenzmischung .....	35
Tab. 4.16: Präzipitationsmix .....	36
Tab. 4.17: 1x Hybridisierungspuffer.....	36
Tab. 4.18: RNase-Mix und -Puffer .....	37
Tab. 4.19: Proteinase-K-Verdau-Mix.....	37
Tab. 4.20: RPA-Gel-Zusammensetzung .....	38
Tab. 4.21: APS .....	38
Tab. 4.22: RIPA-Puffer .....	39
Tab. 4.23: Puffer für den Western-Blot.....	40

Tab. 4.24: Trenngelzusammensetzung (Western-Blot).....	40
Tab. 4.25: Sammelgelzusammensetzung (Western-Blot).....	40
Tab. 4.26: Transfer- und Probenpuffer .....	41
Tab. 4.27: Ponceau S .....	41
Tab. 4.28: Chemilumineszenzlösung.....	42
Tab. 4.29: Primäre Antikörper (Western-Blot) .....	42
Tab. 4.30: Magermilchlösung und TTBS 10x .....	43
Tab. 4.31: Primäre Antikörper für die Immunzytochemie.....	44
Tab. 4.32: Blockierungslösung .....	44
Tab. 4.33: Kulturüberstand (Gelatin-Zymographie).....	45
Tab. 4.34: Gelatin-Zymographie .....	46
Tab. 4.35: Gelatin-Zymographie Lösungen.....	47
Tab. 4.36: Antikörper (Immunzytochemie des OPoSSM-Assays) .....	55
Tab. 4.37: Blockierungslösung .....	55
Tab. 4.38: Immunzytochemie (Migrationsassay) .....	56
Tab. 4.39: Lösungen für Semidünnschnitte .....	57
Tab. 7.1: Darstellung einer Auszählung der Rückenmarksschnitte der A3-Zellreihe ..	109



## 12. Veröffentlichungsliste

### Poster:

“Membrane-Type Matrixmetalloproteinases differentially promote the migration and invasion of murine astrocytes in various *in vitro* assays” **Raphael Merten**, Andreas Voß, Ansgar Schmidt, Catharina Conrad, Jörg W. Bartsch, Axel Pagenstecher. DGNN-Kongress 2011

### **13. Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Adamkiewicz, Aumüller, Barth, Bartsch, Bals, Baum, Basler, Becker, Behr, Bien, Burchert, Cetin, Czubayko, Daut, Engelhart-Cabillic, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Gress, Grzeschik, Grundmann, Hertl, Höffken, Hofmann, Hoyer, Kann, Kircher, Klose, Kolb-Niemann, König, Koolman, Lill, Lohoff, Löffler, Maier, Maisch, Maisner, Moll, Möller, Moosdorf, Mueller, Muller, Mutters, Neubauer, Neumüller, Oertel, Opitz, Pagenstecher, Plant, Renz, Richter, Riße, Roelcke, Röhm, Ruchholtz, Schäfer, Schutz, Sekundo, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Weihe, Werner, Wulff.

## 14. Danksagung

Zuallerst möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. A. Pagenstecher bedanken, der mir dieses spannende und interessante Thema für meine Doktorarbeit zur Verfügung gestellt hat. Zudem hat er mich immer mit seinem wissenschaftlichen Rat unterstützt und motivierend auf mich eingewirkt.

Mein weiterer Dank gilt Ginette Bortoloussi und Sabrina Donges, die mich nicht nur fachlich unterstützten, sondern mir auch freundschaftlich zur Seite standen. Ohne sie wäre vieles nicht möglich gewesen.

Als nächstes möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. J-W. Bartsch und Dr. U. Schlomann dafür bedanken, dass sie mir bei Fragen zu jeder Zeit zur Verfügung standen und die Endphase meiner Arbeit besonders unterstützten. Besonderer Dank gilt Catharina Conrad, die mir immer wieder mit neuen Ideen half und mich fortwährend unterstützte, womit sie einen großen Teil zu dieser Doktorarbeit beigetragen hat.

Desweiteren bedanke ich mich bei Dr. Ansgar Schmidt, bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Neuropathologie für die Beratung, Organisation und Unterstützung der Doktorarbeit.

Mein ganz persönlicher Dank richtet sich an meine Eltern, die mir in meinem Studium und bei meiner Doktorarbeit immer den größtmöglichen Rückhalt gegeben haben. Zudem danke ich ganz besonders meiner Schwester Katharina, die mir oft beratend zur Seite stand. Darüberhinaus gilt auch ein besonderer Dank meinen Freunden, die mich in schwierigen Situationen abgelenkt und aufgemuntert haben.